

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica

***La mitocondria, una diana para la
neuroprotección farmacológica***

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor presentada por

Santos Morais Nicolau

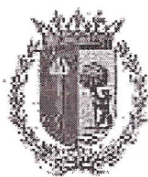
Madrid, 2010

Apocalipsis 22:13

«Yo soy el Alfa y la Omega, el primero y el último, el principio y el fin.»

Salmo 8:4-6

*«¿Qué es el hombre, para que tengas de él memoria,
Y el hijo del hombre, para que lo visites?
Le has hecho poco menor que los ángeles,
Y lo coronaste de gloria y de honra.
Le hiciste señorear sobre las obras de tus manos;
Todo lo pusiste debajo de sus pies.»*



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

D. ANTONIO GARCÍA GARCÍA, Catedrático y Director del Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA, que **D. SANTOS MORAIS NICOLAU** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: **“La mitocondria, una diana para la neuroprotección farmacológica”**, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor.

Para que conste a efectos oportunos, expiden y firman la presente en Madrid a 01 de Septiembre de 2010.

D. Antonio García García

Catedrático de Farmacología

Agradecimientos

Quiero en primer lugar agradecer a Dios por su Amor Ágape hacia mi persona, pues me ha dado gratuitamente la vida en Cristo Jesús.

Al gobierno de Angola (Facultad de Medicina de la Universidad Agostinho Neto) por la beca doctoral a España. En particular al ex-decano Prof^o Simões, al actual decano Prof^o Bettencourt, al personal de la Embajada de Angola en España.

En segundo lugar al Profesor Antonio G. García, por haberme aceptado “ciegamente” como becario en su laboratorio de investigación, por el aprendizaje, dirección y paciencia que de él he recibido. Al Doctor Ângelo da Rosa por su amistad y facilitarme el trámite junto a la comisión doctoral. Al Doctor Javier Egea por enseñarme las técnicas empleadas además de la amistad.

Mis compañeros de laboratorio L1 Juanjo, Antonio Miguel, Lorena, Juli, Maestro Ricardo de Pascoal, Juan Milla, José Carlos Fernández, José Carlos González, Inés, Jaime, Josefina, Regiane, Kléber, Elisa, Prof^o Caricati, Prof^o Jesús, que lo pasamos en grande en estos casi 4 años, por su compañerismo, alegría y apoyo constante. A los colegas Teresa, Noelia, Laura del Barrio, Lola del L3 donde realicé casi todos mis experimentos y cultivamos una buena amistad, en particular a la Profesora Manuela por permitirme usar los equipos y su laboratorio. A los amigos del L7, Profesor Luís Gandía por los apoyos múltiples recibidos, Elena Escalona, Anabel, Ángela. A los colegas de la Princesa.

A los demás Profesores y colegas del Dpto de Farmacología y Terapéutica por vuestras sonrisas.

Al personal administrativo del ITH, Arturo de Diego por resolverme muchísimos asuntos a lo largo de mi estancia doctoral así como Graciela, Elena Revilla, Yolanda, Maria, Antonio Manuel y Eva, sepáis que he disfrutado buen tiempo con ustedes.

Por último a mi familia, mi mamá, mis hermanos, mis sobrinos, mis hijos Jocsan, Janilka y Jeremías, a mi actual pareja Evelize, pues sin ustedes los estudios me serían muy difíciles. Gracias por vuestro amor, cariño y afecto.

A todos vosotros dedico esta tesis doctoral.

INDICE

(I) ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	- 1 -
(II) MARCO EN EL QUE SE PLANTEÓ ESTA TESIS	- 4 -
(III) INTRODUCCIÓN	- 7 -
(1) Enfermedades neurodegenerativas	- 7 -
(2) Enfermedad de Alzheimer	- 8 -
(2.1) Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer	- 11 -
(2.2) Implicación del glutamato y del calcio en la Enfermedad de Alzheimer	- 14 -
(2.3) Fármacos disponibles para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer	- 15 -
(2.4) Hipótesis amiloidea	- 17 -
(2.5) Hipótesis omega-3	- 18 -
(2.6) Hipótesis estrogénica	- 18 -
(2.7) Hipótesis del colesterol	- 18 -
(2.8) Necesidad de nuevos fármacos	- 19 -
(3) La hipótesis de un compuesto neuroprotector multidiana	- 20 -
(3.1) Ligandos de doble acción que inhiben la acetilcolinesterasa y la agregación de A β	- 21 -
(3.2) Ligandos inhibidores de acetilcolinesterasa que actúan en otros sistemas neurotransmisores	- 21 -
(3.3) Ligandos inhibidores de la acetilcolinesterasa con propiedades antioxidantes	- 22 -
(3.4) Ligandos inhibidores de ACE y bloqueadores de los CCDV	- 23 -
(3.5) Ligandos quelantes de metales con propiedades adicionales	- 24 -
(3.6) La memoquina, un ejemplo de compuesto plurifuncional	- 24 -
(3.7) Dimebona y la enfermedad de Alzheimer	- 25 -
(4) Circulación mitocondrial del calcio y enfermedades neurodegenerativas	- 26 -
(4.1) La circulación mitocondrial del calcio regula la bioenergética de la neurona	- 27 -
(4.2) Algunos datos que apoyan la relación entre la modificación de la circulación del calcio mitocondrial y las enfermedades neurodegenerativas	- 29 -
(5) Hipótesis en la que se fundamenta esta tesis doctoral	- 30 -
(6) Objetivos	- 30 -
(IV) MATERIALES Y MÉTODOS	- 32 -
(1) Estudios en células cromafines	- 32 -
(1.1) Cultivo de células cromafines bovinas	- 32 -
(1.2) Determinación de la actividad de la LDH	- 32 -
(1.3) Medida de la viabilidad de las células cromafines con MTT	- 33 -
(1.4) Medida de ROS	- 33 -
(1.5) Medición del potencial de membrana mitocondrial	- 34 -
(1.6) Medición de los niveles del citocromo c en células cromafines bovinas	- 34 -
(1.7) Registros de corrientes y adquisición de datos	- 35 -
(1.8) Medición de las oscilaciones de [Ca ²⁺] _c	- 37 -
(2) Estudios en rodajas de hipocampo	- 37 -
(2.1) Preparación de rodajas de hipocampo de cerebro de ratas Sprague Dawley	- 37 -
(2.2) Protocolos experimentales	- 38 -
(2.3) Medición de la reducción de MTT para estimar la viabilidad neuronal al final de cada experimento	- 39 -
(2.4) Determinación de la producción de ROS en rodajas de hipocampo de rata sometidas al estrés de veratridina	- 39 -
(2.5) Determinación de proteínas por western blott	- 40 -

(3) Análisis de datos y estadística	- 40 -
(V) RESULTADOS	- 41 -
(1) Experimentos realizados con CGP37157 en células cromafines para explorar la hipótesis del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial como diana para la neuroprotección farmacológica (artículo N° 1)	- 41 -
(1.1) Características de los efectos citotóxicos de veratridina	- 41 -
(1.2) El CGP protege las células frente a los efectos citotóxicos de veratridina	- 43 -
(1.3) Efectos del CGP sobre la viabilidad celular cuando se utilizan estímulos citotóxicos distintos de veratridina	- 47 -
(1.4) Efectos de veratridina y CGP sobre la función mitocondrial	- 49 -
(1.5) Efectos de CGP sobre las corrientes de sodio (I_{Na}) y las corrientes de calcio (I_{Ca})	- 53 -
(1.6) El CGP causa un bloqueo reversible de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inducidas por la veratridina	- 56 -
(2) Experimentos realizados con CGP37157 en rodajas de hipocampo para explorar la hipótesis del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial como diana para la neuroprotección farmacológica (artículo N° 2)	- 58 -
(2.1) Efecto neurotóxico de veratridina en rodajas de hipocampo de rata	- 58 -
(2.2) El CGP protege las rodajas de hipocampo de rata frente a la neurotoxicidad inducida por veratridina	- 61 -
(2.3) Efectos de los bloqueantes de los canales de calcio sobre la acción neurotóxica de veratridina	- 63 -
(2.4) El CGP mitiga el exceso de producción de las especies reactivas del oxígeno en rodajas expuestas a veratridina	- 66 -
(2.5) Implicación de la p38 MAPK en los efectos neurotóxicos de veratridina y neuroprotectores de CGP37157	- 67 -
(3) Estudios sobre la interacción del CGP37157 con los bloqueantes de canales de calcio, en células cromafines incubadas con la veratridina	- 69 -
(VI) DISCUSIÓN	- 74 -
(VII) CONCLUSIONES	- 84 -
(VIII) AYUDAS DE INVESTIGACIÓN	- 85 -
(IX) BIBLIOGRAFIA	- 86 -
(X) ARTÍCULO 1 RELACIONADO CON ESTA TESIS	- 102 -
(XI) ARTÍCULO 2 RELACIONADO CON ESTA TESIS	- 103 -

(I) ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Aβ	Amiloide beta
AC	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ADAS-Cog	Escala de evaluación cognitiva del paciente de Alzheimer
AL	Ácido lipoico
ACE	Acetilcolinesterasa
AIF	Factor iniciador de apoptosis
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BUCE	Butirilcolinesterada
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca²⁺	Iones cálcio
CCB	Célula cromafin bovina
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CM-H₂DCFDA	5-(y 6)-clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceina diacetato
DCF	Diclorofluoresceina
DSTA	Demencia senil de tipo Alzheimer
DMEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DHA	Ácido docosahexanoico
DA	Dopamina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EE	Error estándar
EGTA	Ácido etilenglicol-bis- (β -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetraacético
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson

FDA	Del Inglés, Food and Drug Administration, (agencia reguladora de medicamentos de los EEUU)
GSK3	Enzima glucógeno sintasa kinasa
GTP	Trifosfato de guanina
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-etanosulfónico]
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-coenzima A
H2-DCF	Diclorodihidrofluoresceína
5-HT	Receptor para la serotonina (5-hidroxi-triptamina)
I_{Ca}	Corriente de entrada de calcio a través de CCDV
I_{Na}	Corriente de entrada de calcio a través de CCDV
IP₃	Inositol trisfosfato
IACE	Inhibidor de la acetilcolinesterasa
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-ioduro de carbocianina, 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-ioduro de imidacarbocianino
LDMD	Ligandos dirigidos a multidiadas
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAO	Monoamino oxidasa
MTT	Bromuro de tiazolil tetrazolium azul
mNCX	Intercambiador sodio/calcio mitocondrial (del Inglés, mitochondrial Sodium/Calcium Exchanger)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NICE	Instituto nacional para la excelencia clínica, del Reino Unido (del Inglés, National Institute of Clinical Excellence)
Na⁺	Iones sodio
NA	Noradrenalina
ON	Ovillo neurofibrilar
PPA	Proteína precursora de amiloide
PLC	Fosfolipasa C
PKC	Proteína cinasa C
RE	Retículo endoplásmico

ROS	Especies reactivas de oxígeno (del Inglés, Reactive Oxygen Species)
SNC	Sistema nervioso central
TTX	Tetrodotoxina
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

(II) MARCO EN EL QUE SE PLANTEÓ ESTA TESIS

La tesis que presento para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid aporta datos que sugieren una nueva diana terapéutica para el desarrollo de nuevos medicamentos neuroprotectores para tratar la enfermedad de Alzheimer a saber, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la mitocondria. La presente tesis Doctoral se ha desarrollado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid. El ITH ha cultivado a lo largo de los últimos 20 años una sólida línea en el campo de la comunicación interneuronal y de los mecanismos de muerte neuronal por apoptosis y necrosis, procesos que regula el catión calcio (Ca^{2+}).

El Ca^{2+} es un segundo mensajero universal. Casi todo lo que hacemos está controlado por calcio, desde la fecundación del ovocito en el origen de la vida hasta la muerte de la célula por apoptosis o necrosis, ya que este ión participa en la formación de memoria y en el procesamiento de la información en el cerebro. Es uno de los mediadores intracelulares más versátiles de todo el organismo. Interviene en procesos tan diversos como la contracción muscular, la secreción hormonal y de neurotransmisores, la coagulación de la sangre, el metabolismo celular, el control de canales iónicos, la expresión de genes, la inmunidad, o la muerte neuronal por necrosis o apoptosis.

El calcio interviene, entre otros procesos, en la regulación de la comunicación interneuronal, esto es, en la neurotransmisión. A lo largo de los últimos 20 años, nuestro grupo ha realizado diversos estudios encaminados al esclarecimiento del papel del calcio como mediador de los procesos de neurotransmisión (García *et al.*, 1984; Moro *et al.*, 1993; Montero *et al.*, 2000; García *et al.*, 2006). También el ITH ha cultivado durante las dos últimas décadas una línea de investigación relacionada con el calcio y la muerte neuronal (Maroto *et al.*, 1994; Cano-Abad *et al.*, 2000; Cano-Abad *et al.*, 2001; Cano-Abad *et al.*, 2002; Sobrado *et al.*, 2004; Egea *et al.*, 2007b; Nicolau *et al.*, 2009).

En relación al doble papel neurotóxico-neuroprotector del calcio, en los últimos años el ITH se ha embarcado en un nuevo proyecto relacionado con la búsqueda de nuevos compuestos neuroprotectores que ha sintetizado en colaboración con grupos de químicos del CSIC; esta tesis servirá como punto de partida para explorar la hipótesis de que el mNCX podría ser una nueva diana para la neuroprotección, y plantea la estrategia que se seguirá para conocer el posible efecto regulador de estos compuestos sobre el mNCX, y su potencial neuroprotector. Estos compuestos están protegidos por patentes españolas, europeas y estadounidenses. De las 8 patentes activas, reseño las siguientes:

1) Síntesis y evaluación farmacológica de nuevos derivados de tacrina que modulan canales de calcio y receptores nicotínicos neuronales

Inventores: M. Villarroya, J.L. Marco, C. de los Rios y A.G. García

N. de solicitud: P200200937; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 22/4/2002

Entidad titular: Universidad Autónoma de Madrid y CSIC

2) Síntesis y evaluación biológica de nuevos análogos de tacrina que bloquean canales de calcio neuronales e inhiben acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa potenciales agentes neuroprotectores para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson

Inventores: J.L. Marco, C. de los Rios, M. Villarroya y A.G. García

N. de solicitud: P200200936; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 22/4/2002

Entidad titular: CSIC y Universidad Autónoma de Madrid

3) Derivados de [1]benzopirano[2,3-b]quinolin-1(2H)-ona

Inventores: J.L. Marco, R. León, A.G. García y M. Villarroya

N. de solicitud: P200601196; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 10/05/2006

Entidad titular: CSIC y Universidad Autónoma de Madrid

4) Nuevos derivados de aminoácidos dicarboxílicos y su aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Inventores (p.o. de firma): Conde Ruzafa, S.; Rodríguez-Franco, M. I.; Arce García, M. P.; González Muñoz, G. C.; Villarroya Sánchez, M.; García López, M.; García García, A.

Nº de solicitud: P200703264

País de prioridad: España

Fecha de prioridad: 10/12/2007

Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad
Autónoma de Madrid

Nº de registro en la oficina Europea de patentes: 08858498.2

Fecha de entrada en el registro Europeo: 09/07/2010

Nº de registro en la oficina de los EEUU de patentes: 12747254

Fecha de entrada en el registro estadounidense: 10/06/2010

Concesión patente española: 16 de marzo de 2010

CO7C 237/22 (2006.01) A61K 31/197 (2006.01).

La presente Tesis está basada principalmente en dos de las líneas de investigación del ITH, a saber: (1) el calcio y la muerte neuronal, y (2) el doble papel “neurotóxico-neuroprotector” del calcio que permitirá sintetizar análogos del CGP37157 (CGP), proyecto ya en marcha. Parte de los resultados presentados en esta Tesis están en las siguientes publicaciones, además de otros tres manuscritos que están preparándose:

1. Nicolau SM., de Diego AM., Cortés L., Egea J., González JC., Mosquera M., López MG., Hernández-Guijo JM. and García AG. **Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺-exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **330**:844-854, 2009.
2. Nicolau, SM, Javier Egea, Manuela G. López and Antonio G. García. **Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices.** Biochemical and Biophysical Research Communications 2010, **doi: 10.1016/J.bbrc.2010.08.028**

La aportación fundamental de esta tesis reside en el apoyo que sus datos prestan a la hipótesis de que la regulación farmacológica de la circulación mitocondrial del Ca²⁺ puede ejercer efectos neuroprotectores, y rescatar de la muerte a las neuronas vulnerables de la enfermedad de Alzheimer. Aporta también una nueva diana para el diseño y la síntesis de derivados del CGP con potencialidad para modular el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial.

(III) INTRODUCCIÓN

En esta Introducción revisaré la problemática de las enfermedades neurodegenerativas, haciendo énfasis en la enfermedad de Alzheimer (EA). Comentaré los tratamientos farmacológicos vigentes, así como las dianas terapéuticas relacionadas con la patogenia de la EA, que están siendo objeto de la búsqueda de nuevos compuestos dirigidos a las mismas. Finalmente, haré una breve revisión de la circulación mitocondrial del calcio (mCC) y de su regulación por el uniportador (UP), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX) y el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP); durante la actividad neuronal, la mCC regula los niveles citosólicos y mitocondriales de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) y ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) para mantener la bioenergética mitocondrial y acoplar la síntesis de ATP a la actividad neuronal.

(1) Enfermedades neurodegenerativas

Con el aumento de la esperanza de vida y la demografía cambiante de la población, se espera que aumente significativamente en el siglo XXI la incidencia de enfermedades del sistema nervioso central (SNC). Las más graves de las enfermedades del SNC son las enfermedades neurodegenerativas, que se caracterizan por la disminución gradual de las funciones neuronales con la edad, a menudo acompañada de la muerte neuronal. La enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) son algunos ejemplos de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, las estrategias que se siguen para el tratamiento eficaz de las enfermedades neurodegenerativas son muy limitadas por el momento (Sullivan *et al.*, 2001; Fratiglioni *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009).

Hoy se acepta que las enfermedades neurodegenerativas tienen una naturaleza multisistémica y esto presenta numerosas dificultades para un posible tratamiento de las mismas. La muerte de determinados tipos de neuronas en enfermedades neurodegenerativas se produce mediante una

compleja secuencia de eventos moleculares y celulares (Figura 1). La situación es aún más complicada, debido al difícil acceso de los fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE); por otra parte, el 98% de los fármacos administrados para el tratamiento de estas enfermedades tiene una cinética de liberación que causa efectos secundarios a nivel periférico (Lockman *et al.*, 2002).

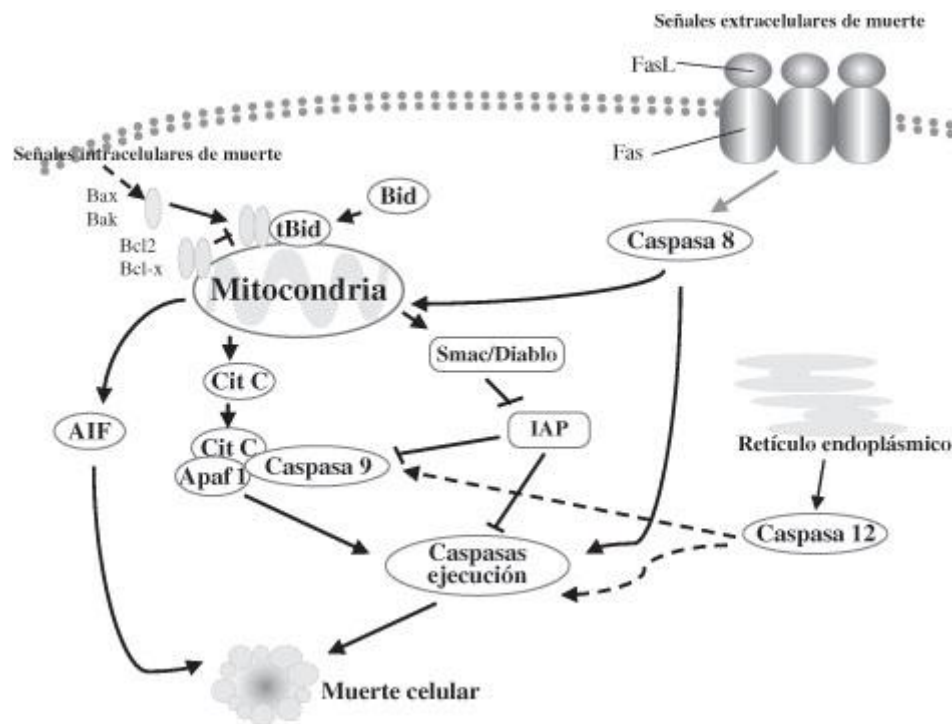


Figura 1. Secuencia de eventos que conducen a la muerte neuronal o celular: señales extracelulares a través de los receptores de muerte celular, tales como Fas, y señales intracelulares, incluyendo el daño a constituyentes subcelulares o estrés del retículo endoplásmico, activan vías de muerte celular genéticamente programadas. Las dos vías pro-apoptóticas indicadas resultan en la activación de caspasas ejecutoras que conduce finalmente a la muerte celular. AIF (factor inductor de apoptosis), Cit c (Citocromo c), FasL (ligando de Fas), IAP (inhibidor de apoptosis), tBid (Bid trunco). (Vila & Przedborski, 2003).

(2) Enfermedad de Alzheimer

La EA se conoce también como mal de Alzheimer o demencia senil de tipo Alzheimer (DSTA) o simplemente alzheimer. La neuropatología característica de la enfermedad fue observada por primera vez por Alois Alzheimer en 1906. El alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa y es frecuente en la población de edad avanzada; la enfermedad cursa con un deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida

progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales; a medida que las neuronas mueren se atrofian diferentes zonas del cerebro, principalmente la corteza cerebral. La causa principal de la EA es desconocida. Se han identificado más de 20 mutaciones diferentes relacionadas con la enfermedad (Rocchi *et al.*, 2003). Destacan las de presenilina-1 (PS1), presenilina-2 (PS2) y genes de la proteína precursora de amiloide (PPA) que directamente causan la EA (Figura 2), y son vinculados con la fisiopatología de la misma, siendo por lo menos responsables del 1% de todos los casos de la EA de tipo familiar (EAF) (Skoog & Skoog, 1999).

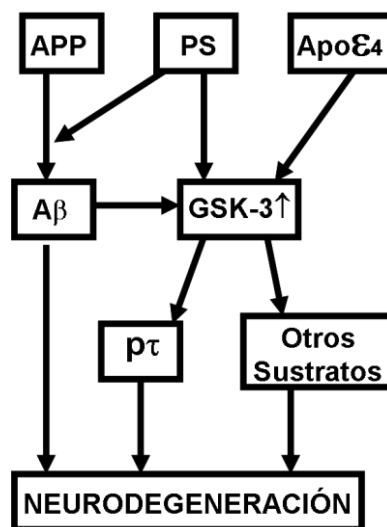


Figura 2 Relación de las diferentes vías que intervienen en la enfermedad de Alzheimer. Las mutaciones en la PPA, PS1 y PS2, que resultan en el aumento del péptido Aβ, sumado a la presencia de algunas isoformas de APOE4, hacen que aumente la actividad de la enzima glucógeno sintasa kinasa 3 que hiperfosforila la proteína tau. Todos esos cambios son tóxicos para la célula condenada a morir.

La mayor parte de los enfermos de Alzheimer (hasta el 99%) padece la enfermedad esporádica. En general, los enfermos presentan una amplia pérdida de las neuronas, debido a la existencia de placas seniles (Figura 3A) y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral y el hipocampo (Figura 3B).

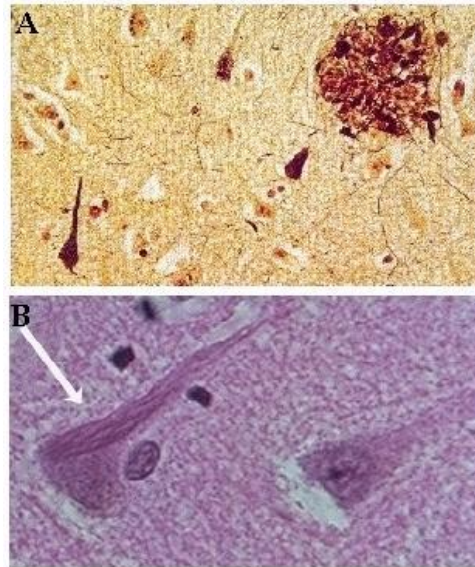


Figura 3 Histología de la demencia tipo Alzheimer. **(A)** Placa amiloide de forma redondeada en el hipocampo (región cerebral vinculada a la memoria) de un paciente con Alzheimer. Las placas contienen proteína amiloide (anormal) y acetilcolinesterasa. Las estructuras oscuras y triangulares son neuronas en degeneración, conteniendo ovillos neurofibrilares. **(B)** Ovillo neurofibrilar, típico del Alzheimer, en el interior de una neurona. Aparece como una acumulación de filamentos en el citoplasma. Resulta de una desorganización del esqueleto celular por presencia de proteínas anormales.
www.maxpowersite.com/ea_archivos/page326.html

En el informe mundial sobre la prevalencia de la EA en 2009, según el Alzheimer's Disease International (ADI), se destaca que esta enfermedad es la forma más frecuente de las demencias, que afecta a millones de personas en el mundo entero, estimándose que 35,6 millones de personas en todo el mundo padecerán demencia en 2010. Se calcula que esta cifra se duplique cada 20 años, hasta los 65,7 millones en 2030 y los 115,4 millones en 2050 (Tabla 1). La EA se caracteriza no solo por las manifestaciones ya mencionadas anteriormente, sino también por la discapacidad intelectual de la personas para pensar, aprender, recordar, hablar y comunicarse.

Región GBD (Carga Mundial de Morbilidad)	Población mayor de 60 (millones)	Prevalencia preliminar estimada (%)	Número de personas con demencia (millones)			Incrementos proporcionales (%)	
	2010	2010	2010	2030	2050	2010-2030	2010-2050
ASIA	406,55	3,9	15,94	33,04	60,92	107	282
Australasia	4,82	6,4	0,31	0,53	0,79	71	157
Asia Pacífico	46,63	6,1	2,83	5,36	7,03	89	148
Oceanía	0,49	4,0	0,02	0,04	0,10	100	400
Asia central	7,16	4,6	0,33	0,56	1,19	70	261
Asia oriental	171,61	3,2	5,49	11,93	22,54	117	311
Asia meridional	124,61	3,6	4,48	9,31	18,12	108	304
Sudeste asiático	51,22	4,8	2,48	5,30	11,13	114	349
EUROPA	160,18	3,9	15,94	33,04	60,92	107	282
Europa occidental	97,27	7,2	6,98	10,03	13,44	44	93
Europa central	23,61	4,7	1,10	1,57	2,10	43	91
Europa oriental	39,30	4,8	1,87	2,36	3,10	26	66
LAS AMÉRICAS	120,74	6,5					246
Norteamérica	63,67	6,9	4,38	7,13	11,01	63	151
Caribe	5,06	6,5	0,33	0,62	1,04	88	215
Latinoamérica andina	4,51	5,6	0,25	0,59	1,29	136	416
Latinoamérica central	19,54	6,1	1,19	2,79	6,37	134	435
Latinoamérica meridional	8,74	7,0	0,61	1,08	1,83	77	200
Latinoamérica tropical	19,23	5,5	1,05	2,58	5,54	146	428
ÁFRICA	71,07	2,6	1,86	3,92	8,74	111	370
Norte de África / Oriente Medio	31,11	3,7	1,15	2,59	6,19	125	438
África Subsahariana central	3,93	1,8	0,07	0,12	0,24	71	243
África Subsahariana oriental	16,03	2,3	0,36	0,69	1,38	92	283
África Subsahariana meridional	4,66	2,1	0,10	0,17	0,20	70	100
África Subsahariana occidental	15,33	1,2	0,18	0,35	0,72	94	300
MUNDO	758,54	4,7	35,56	65,69	115,38	85	225

Tabla 1. Prevalencia de la demencia tipo alzheimer en el mundo entero para el año 2010 y estimaciones de aumento para los próximos 40 años. Informe mundial sobre el Alzheimer en 2009 según el Alzheimer's Disease International en su página web www.alz.co.uk

Además los pacientes sufren problemas emocionales y psiquiátricos como agitación, depresión, delirio y baja autoestima. Las características patológicas incluyen una atrofia general del cerebro con una pérdida específica de las neuronas colinérgicas, con el consiguiente deterioro de la neurotransmisión colinérgica. Se cree que el evento clave que conduce a la progresiva degeneración de las neuronas colinérgicas, es la agregación del péptido amiloide beta ($A\beta$), que favorece los efectos neurotóxicos de los aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato (Harkany *et al.*, 1999).

(2.1) Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

Las características neuropatológicas de la EA son las placas seniles, la angiopatía amiloidea y los ovillos neurofibrilares (ON). Estos cambios, aunque

fisiopatológicamente relacionados con el desarrollo de la EA y que, además se exigen para el diagnóstico definitivo, no son específicos para la enfermedad, porque pueden también encontrarse en otros tipos de enfermedades neurodegenerativas (Boller *et al.*, 1980; Bierer *et al.*, 1995; Scherzinger *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998; Edison *et al.*, 2008; Gomperts *et al.*, 2008).

El péptido principal en la placa amiloidea es el A β ; es un péptido hidrofóbico con 39-43 residuos aminoacídicos. La isoforma 42 del péptido (A β -42) es la más abundante en la placa amiloidea, mientras que los 40 aminoácidos de la isoforma A β -40 es el péptido preferentemente acumulado en la angiopatía amiloidea. El A β es el resultado del procesamiento de la PPA, una proteína transmembrana (Hardy & Selkoe, 2002; Zheng & Koo, 2006). El PPA se expresa en todo tipo de células y se metaboliza por dos vías alternativas, vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica (Figura 4). En la primera, la enzima α -secretasa corta el PPA produciendo PPA soluble (PPAs) y la γ -secretasa corta el fragmento del C-terminal en su parte intramembrana produciendo el péptido p3. El papel fisiológico del PPA y sus fragmentos es desconocido, pero algunos investigadores sugieren un papel crucial del mismo en la regeneración neuronal (Small *et al.*, 1994; Sabo *et al.*, 2001) y otros creen que está directamente implicado en la fisiopatología de la EA (Haass *et al.*, 1997). En la vía amiloidogénica, el PPA es procesado primero por la β -secretasa, produciendo el β -PPA que a continuación se procesa por la γ -secretasa y de esta manera se produce el péptido A β (Octave, 1995).

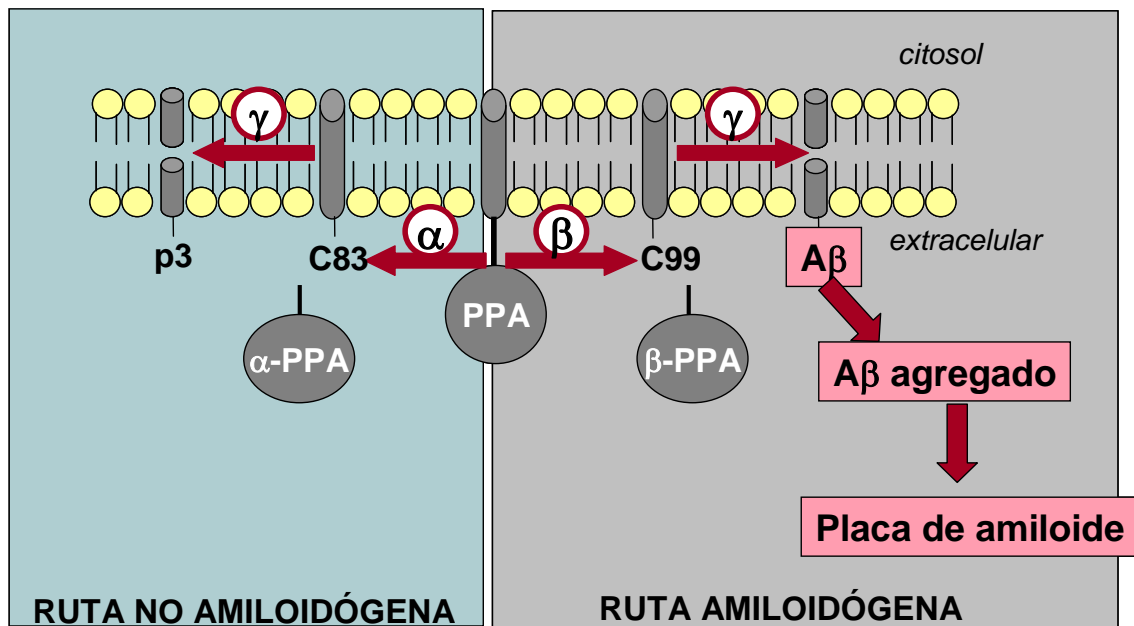


Figura 4 Rutas que conducen a la síntesis del Aβ a partir de su precursor PPA. Se ha prestado mayor atención a la ruta amiloidogénica, por ser la que está implicada en la EA.

Además de la agregación del Aβ extracelular, en la EA también se encuentra la formación de los ovillos neurofibrilares (ON) en el interior de la célula (Figura 3B). Estructuralmente, los ON son filamentos helicoidales pareados y rectos (Rubenstein *et al.*, 1986), que son el resultado de una fosforilación anormal de la proteína tau (Goedert *et al.*, 1988; Goedert *et al.*, 2006). La unión de la proteína tau a la tubulina favorece la estabilidad de los microtúbulos (Goedert, 1993); por el contrario, la proteína tau hiperfosforilada disocia los microtúbulos y secuestra la tau normal. Esta estructura insoluble de tau hiperfosforilado, daña las funciones celulares tanto en el citoplasma como en el transporte axonal, que conducen así a la muerte celular (Mudher & Lovestone, 2002). La proteína tau es fosforilada por la enzima glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3) (Figura 5) (Hanger *et al.*, 2009).

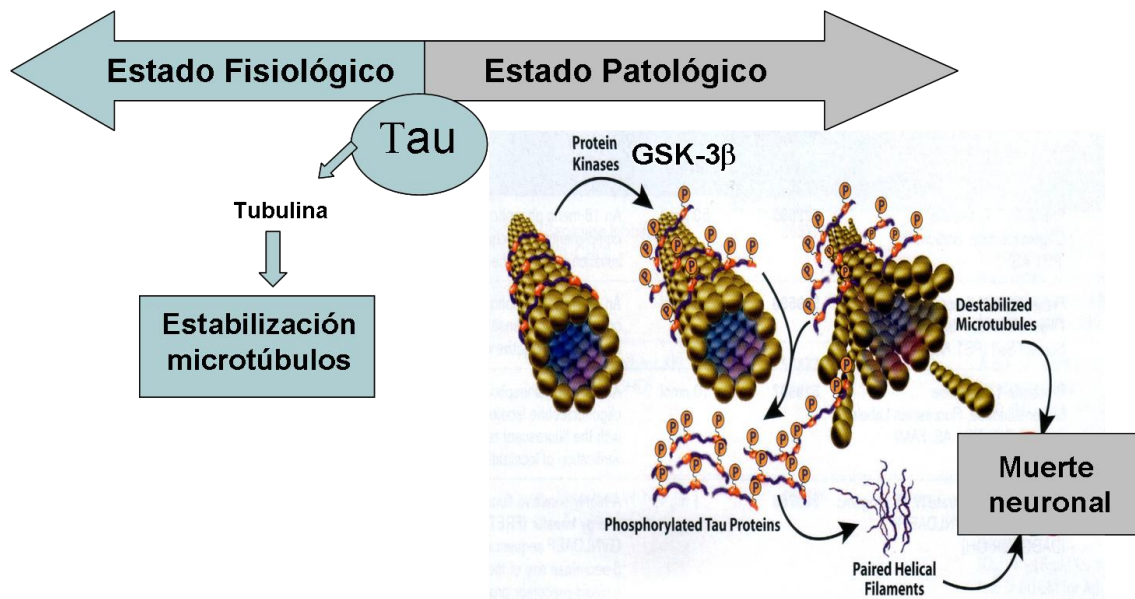


Figura 5 Implicación de la hiperfosforilación de tau tanto en la estabilización de microtúbulos y transporte axonal, como en la fisiopatología de la EA.

(2.2) Implicación del glutamato y del calcio en la Enfermedad de Alzheimer

El glutamato actúa como neurotransmisor en organismos tan diversos como insectos, gusanos, anfibios y mamíferos (Usherwood *et al.*, 1968). Es el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos y es por tanto esencial para todo nuestro comportamiento (Shepherd & Huganir, 2007). Aunque se conoce bien su papel sináptico en el sistema nervioso maduro, este neurotransmisor es también de vital importancia durante el desarrollo, ya que participa en la regulación de la neurogénesis, sinaptogénesis y en la muerte celular programada o “apoptosis” (Mattson, 1996).

Existen dos grandes grupos de receptores para el glutamato: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Entre los receptores ionotrópicos de glutamato destacan el de kainato, el α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato conocido como receptor AMPA, que permea principalmente sodio (Na^+) y algún calcio (Ca^{2+}), mientras que el receptor N-metil-D-aspartato conocido como receptor NMDA, permea grandes cantidades de Ca^{2+} (Rao & Finkbeiner, 2007). La activación de los receptores AMPA despolarizan la membrana, resultando en la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y del canal del receptor NMDA. Los metabotrópicos están acoplados a la proteína Gq11 unida a la

guanosina trifosfato (GTP), que a su vez activa la fosfolipasa C (PLC), resultando en la producción del inositol trisfosfato (IP3) que produce la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE), y la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Gerber *et al.*, 2007).

(2.3) Fármacos disponibles para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

En la década de 1970 se planteó la posibilidad de que al esclarecerse las alteraciones neuroquímicas de la EA se podría plantear el desarrollo racional de una terapia para la EA. En esta misma década, estudios pos-mortem con cerebros de pacientes con alzheimer hallaron una reducción de neuronas colinérgica en el núcleo basal de Meynert, confirmándose así la existencia de un importante déficit colinérgico presináptico (Francis *et al.*, 1999). Esto dio lugar a la hipótesis de un déficit colinérgico, que fue la teoría dominante sobre la etiopatogenia de la EA al principio de la década de 1980. Muchos síntomas de la demencia y, especialmente las dificultades del aprendizaje y déficits cognitivos se explicaron por la carencia de acetilcolina. Se esperaba así que el restablecimiento del equilibrio colinérgico, por inhibición de la pérdida neuronal, frenara el avance de la enfermedad y mejorara la cognición y el funcionamiento general de los pacientes. En 1993, la FDA aprobó el primer medicamento para el tratamiento de la EA, la tacrina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa (IACE), que pronto sería seguido por otros con el mismo mecanismo de acción; a saber, el donezepilo en 1996, la rivastigmina en 2000 y la galantamina en 2001 (Figura 6).

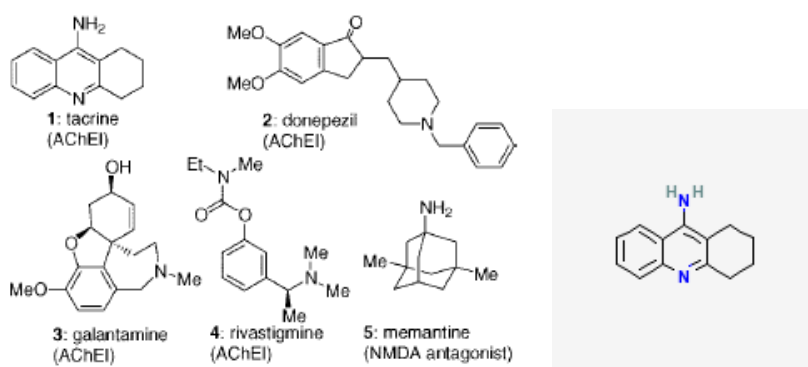


Figura 6 Estructuras químicas de fármacos disponibles en la clínica para el tratamiento de la EA.

A pesar de poseer un modesto efecto inhibitor de la ACE, la galantamina mejora la memoria según la prueba ADAS-Cog (del Inglés, escala de evaluación cognitiva del paciente de Alzheimer) y enlentece el deterioro cognitivo de los pacientes de alzheimer. Para explicar este efecto terapéutico se ha acudido a un segundo mecanismo de acción de la galantamina, la modulación alostérica positiva de receptores nicotínicos presinápticos, que favorecería la liberación de acetilcolina y de otros neurotransmisores implicados en la formación de memoria en el hipocampo. Además, la galantamina posee efectos antiapoptóticos y neuroprotectores (Arroyo *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005). El uso de la tacrina se ha visto limitado por la pobre biodisponibilidad oral y las considerables reacciones adversas del medicamento.

La acción tóxica del glutamato y el aspartato está mediada por la activación de los receptores NMDA. Esta activación produce un aumento en la concentración del calcio intracelular que desencadena una cascada de reacciones patológicas que causan la muerte de las neuronas. La perturbación de la neurotransmisión glutamatérgica parece ser la base de los mecanismos patogénicos y del déficit cognitivo en la EA. Por lo tanto, los antagonistas de los canales de calcio y de los receptores NMDA son actualmente un foco de interés para su uso potencial como agentes neuroprotectores en los tratamientos de esta enfermedad. Por ello se introdujo en la clínica la memantina, un antagonista del receptor NMDA que fue aprobado como fármaco para el tratamiento de la EA en 2003 (Figura 6).

La memantina modula la actividad del receptor NMDA (van Marum, 2008). El bloqueo no competitivo y reversible del receptor NMDA, permite la transmisión fisiológica asociada con el funcionamiento normal de las neuronas, en presencia de memantina (Chohan & Iqbal, 2006). La eficacia clínica de la memantina, que ha sido aprobada para el tratamiento de la EA moderada a grave, parece ser menor que la de los IACE (McShane *et al.*, 2006). La memantina es cada vez más usada asociada a los IACE; ciertos estudios indican que actuando tanto en la vía colinérgica como glutamatérgica se

podrían obtener mejores resultados clínicos (Tariot *et al.*, 2004; Grossberg *et al.*, 2006).

(2.4) Hipótesis amiloidea

En la actualidad la hipótesis amiloidea, presentada hace casi dos décadas, es la más utilizada para explicar la fisiopatología de la EA (Hardy *et al.*, 1992). En esta hipótesis, la acumulación patológica de A β en el cerebro conduce al estrés oxidativo, la destrucción de las neuronas y por último, al síndrome clínico de la EA. Aunque la base de esta hipótesis está ampliamente documentada, existen teorías alternativas en las que el A β no es la causa del estrés oxidativo sino que puede incluso ejercer una acción neuroprotectora, relacionada con una respuesta adaptativa de las neuronas al estrés oxidativo causado por otros factores (Lee *et al.*, 2007).

El A β tiene una tendencia a agregarse en oligómeros. La formación de oligómeros de amiloide provoca inflamación local y neurotoxicidad. Como resultado de este proceso, la proteína tau se plegará en ovillos intraneuronales, que resulta en la muerte celular. La destrucción neuronal progresiva lleva a la escasez y desequilibrio entre los diferentes neurotransmisores, y a la deficiencia cognitiva característica de la EA. A raíz de esta hipótesis, algunos investigadores plantearon la idea de que la prevención secundaria de la EA pudiera hacerse a través de alguna de las estrategias siguientes:

- Decreciendo la producción de A β ;
- Estimulando el aclaramiento del A β formado;
- Previniendo la agregación de A β en placas amiloideas;
- Previniendo la lesión neuronal mediante la limitación de la inflamación y la neurotoxicidad causada por A β .

Asimismo se estimó que la terapia de reemplazo de la pérdida de los neurotransmisores es la última opción, después de la cascada amiloidea (van Marum, 2008).

(2.5) Hipótesis omega-3

Esta hipótesis implica que el consumo adecuado del ácido docosahexanoico (DHA), un ácido graso poliinsaturado, específicamente omega-3, está asociado con la reducción del riesgo de EA (Kalmijn *et al.*, 2004). DHA abunda en el cerebro, por lo que su ingestión con la dieta podría ser efectiva en el tratamiento de la EA a través de su mecanismo anti-amiloideo, antioxidante y neuroprotector (Lim *et al.*, 2005). Sin embargo, un ensayo clínico con 204 pacientes con EA leve y moderada, que tomaron omega-3 durante 12 meses, no mostró retraso en la tasa del deterioro cognitivo, medido con la escala ADAS-cog. Pero sí se observaron efectos positivos en un pequeño grupo de pacientes con EA muy leve (Freund-Levi *et al.*, 2006).

(2.6) Hipótesis estrogénica

Contrariamente a los datos epidemiológicos, que sugerían un efecto neuroprotector de los estrógenos, en los ensayos clínicos no se encontró eficacia alguna en la EA. En un estudio realizado en 120 mujeres con enfermedad en estadios de leve a moderada, el tratamiento sustitutivo con estrógenos durante 1 año no detuvo ni mejoró los parámetros globales, cognitivos o funcionales (Mulnard *et al.*, 2000).

(2.7) Hipótesis del colesterol

El aumento del nivel de colesterol favorece la producción de A β (Kuller, 2007). Además, los animales tratados con inhibidores de la hidroximetil glutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), conocidos como estatinas, reducen la producción de A β . Un estudio retrospectivo muestra una relación entre el uso de estatinas y una prevalencia reducida de EA; pero otros estudios epidemiológicos longitudinales no mostraron reducción del riesgo de EA entre los que tomaron estatinas y los controles (Jick *et al.*, 2000). La reducción del colesterol por las estatinas puede alterar el metabolismo de la PPA y de este modo reducir la producción de A β . Las estatinas muestran también efectos

inmunomoduladores, bloqueando la capacidad de la citocina interferon- γ para activar las células T. Por lo tanto, las estatinas podrían poseer un efecto neuroprotector por mitigar la inflamación. Sin embargo, no se han encontrado pruebas directas de los efectos de las estatinas sobre los marcadores neuropatológicos de la EA.

(2.8) Necesidad de nuevos fármacos

En su revisión de 2006, la Colaboración Cochrane concluye que los resultados de 10 ensayos clínicos aleatorizados, doble ciego, controlados con placebo demuestran que el tratamiento con donezepilo, galantamina o rivastigmina en dosis recomendados para personas con demencia leve, moderada o grave debida a la EA, produjo mejorías en la función cognitiva, en un promedio de 2,7 puntos, en la escala de 70 puntos en la ADAS-Cog. Los médicos del estudio calificaron el estado clínico general como más positivo en los pacientes tratados. Los beneficios del tratamiento también se observaron en las mejorías de las actividades de la vida diaria y comportamiento de los pacientes. Sin embargo, ninguno de estos efectos del tratamiento fue acusado (Birks, 2006).

Por otra parte, el NICE ("National Institute for Clinical Excellence", del Reino Unido), en su revisión de 2006, concluye lo siguiente: el donepezilo, la galantamina y la rivastigmina se recomiendan para el tratamiento de la EA moderada solamente. La memantina no se recomienda para las personas con EA moderadamente grave a grave, a menos que se utilice en el contexto de un ensayo clínico. El NICE confirmó esta conclusión en septiembre de 2009.

Dada la controversia de los resultados publicados tanto por Cochrane como por NICE, el cuestionamiento y fracaso de las hipótesis de tratamientos patogénicos analizados antes y sumada la complejidad de la EA, parece claro que urge investigar nuevas dianas que conduzcan a la síntesis de nuevos fármacos que mitiguen los síntomas pero, sobre todo, que posean efectos neuroprotectores y que enlentezcan el avance de la enfermedad.

(3) La hipótesis de un compuesto neuroprotector multidiana

Puesto que la prescripción de un solo fármaco actuando sobre una sola diana parece poco eficaz, se ha pensado en la administración de dos o tres fármacos concomitantemente con diferentes mecanismos de acción. El segundo enfoque consiste en la utilización de una “polipíldora”, que contendría en una sola formulación diferentes principios activos; con ello se simplificarían las dosis y la cantidad de medicamentos a prescribir al paciente. Finalmente ha surgido un tercer enfoque a base de un solo compuesto que tenga múltiples propiedades biológicas/farmacológicas para actuar en varias dianas, lo que supondría una ventaja sobre los dos postulados o enfoques anteriores (Cavalli *et al.*, 2008).

Este último enfoque ha ganado consistencia en los últimos años, partiendo de la idea de diseños similares destinados a enfermedades no neurodegenerativas (Morphy *et al.*, 2004; Morphy & Rankovic, 2005, , 2007). Así, se han diseñado compuestos dirigidos al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, proponiéndose el término de *ligandos múltiples* para describir los compuestos cuyo perfil biológico múltiple se diseña racionalmente para tratar una enfermedad en particular, en este caso neurodegenerativa. En la actualidad se ha acuñado el término de *ligandos dirigidos a multi dianas* (LDMD), para referirse a los compuestos que muestran eficacia en el tratamiento de enfermedades de etiología y patogenia complejas, debido a su capacidad para interactuar con diferentes dianas que se cree son responsables de la patogénesis de la EA (Figura 7).

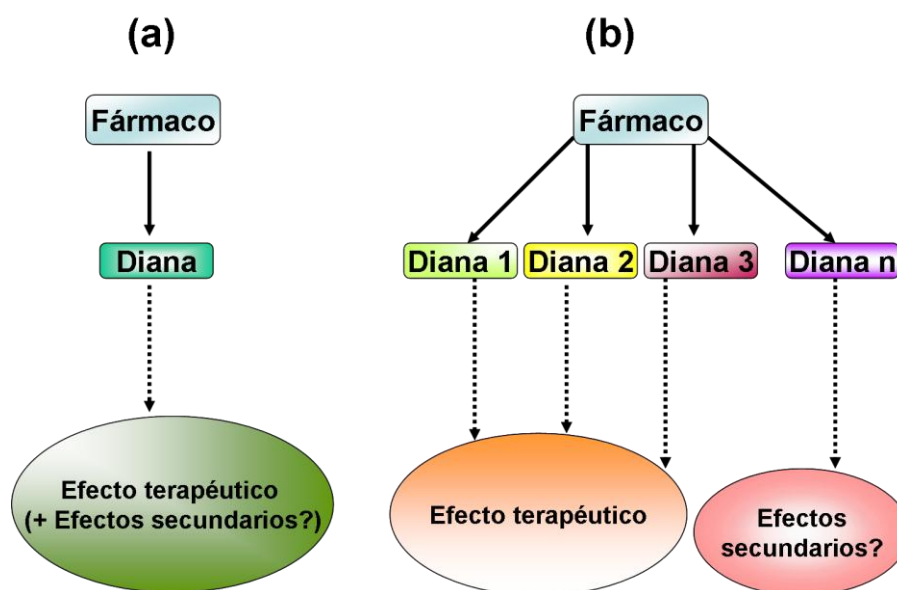


Figura 7 Vías que conducen a la síntesis de nuevo fármacos. a) el modelo actualmente usado de un fármaco y una diana; b) estrategia que se propone para la síntesis de ligandos dirigidos a múltiples dianas. (Adaptado de Cavalli et al., 2008).

Siguiendo esta hipótesis, se han diseñado y sintetizado compuestos dirigidos a dos o más dianas, como describo a continuación:

(3.1) Ligandos de doble acción que inhiben la acetilcolinesterasa y la agregación de A β

El objetivo de estos ligandos es interactuar simultáneamente con el sitio periférico y catalítico de la ACE, aliviando así el déficit cognitivo en los pacientes, al restaurar la actividad colinérgica y a la vez reducir la agregación de A β . Entre estos ligandos contamos con la caproctamina y sus derivados, tetra amino disulfuro benextramina (Melchiorre *et al.*, 1998; Melchiorre *et al.*, 2003) y derivados de xantostigmina (Belluti *et al.*, 2005).

(3.2) Ligandos inhibidores de acetilcolinesterasa que actúan en otros sistemas neurotransmisores

La relación entre los déficits de neurotransmisores en el cerebro de los pacientes de alzheimer y los síntomas clínicamente observados, como el declive de la cognición y las anormalidades neuropsiquiátricas, están bien documentadas. Es conocido además, que el deterioro de la cognición está

íntimamente relacionado con la pérdida de neuronas colinérgicas y glutamatérgicas. Sin embargo, los cambios del comportamiento no solo tienen que ver con los dos citados sistemas de neurotransmisión, pues también tienen relación con la neurotransmisión serotoninérgica y adrenérgica. Por ejemplo, el déficit de noradrenalina (NA) en el paciente con alzheimer proviene de la atrofia del locus coeruleus y está vinculado con la depresión (Gottfries, 1990); en contraste, el déficit de serotonina (5-HT) tiene su origen en la atrofia de los núcleos del rafe y está vinculado con la depresión y la psicosis (Meltzer *et al.*, 1998).

Algunos ensayos clínicos combinando un inhibidor selectivo de monoamino oxidasa (MAO) tipo selegilina, con fisostigmina (un inhibidor de ACE), mostraron sinergismo (Schneider *et al.*, 1993; Marin *et al.*, 1995); ello sugiere que la inhibición de la MAO es un aspecto interesante que debe tenerse en cuenta al diseñarse compuestos para la EA. De hecho, los inhibidores de la MAO, durante su actividad catalítica de la desaminación de los neurotransmisores NA, 5-HT y dopamina (DA), generan H₂O₂, que probablemente sea la fuente del estrés oxidativo que daña las neuronas en la EA (Alper *et al.*, 1999). El diseño inicial consistió en una combinación química de selegilina con fisostigmina, dando lugar a una serie de ligandos que son inhibidores aún más irreversibles de la MAO. Pero también se han hecho cambios en las estructuras de rasagilina y selegilina introduciéndoles grupos carbamato, resultando en inhibidores tan potentes de MAO-B como es el caso de ladostigil, que además de su actividad IACE tiene propiedades neuroprotectoras, antidepresivas y de reducir el estrés oxidativo (Sterling *et al.*, 2002).

(3.3) Ligandos inhibidores de la acetilcolinesterasa con propiedades antioxidantes

La reconocida evidencia sobre la participación del estrés oxidativo en la patogénesis de la EA, ha conducido a la idea de diseñar compuestos que actúen en la fuente de producción de especies reactivas de oxígeno. En la

búsqueda de LDMD capaces de actuar con la mayor anticipación posible en la cascada neurodegenerativa, se utilizó la estructura del ácido lipoico (AL), un antioxidante que ejerce diferentes efectos protectores en la neurodegeneración subyacente (Holmquist *et al.*, 2007). El AL se combinó con un grupo farmacóforo dotado de propiedades biológicas bien establecidas, es decir, la capacidad de inhibir la actividad de la ACE (Rosini *et al.*, 2005). También se argumentó que la fracción cíclica de ácido lipoico podría interactuar con el sitio aniónico periférico de la acetilcolinesterasa, que se asocia con la agregación de A β . De este modo, se diseñó la lipocrina, que combina las propiedades antioxidantes del AL en una sola molécula con la inhibición de la ACE, mejorando así la transmisión colinérgica, inhibición de la agregación de A β y el del estrés oxidativo (Bolognesi *et al.*, 2006).

(3.4) Ligandos inhibidores de ACE y bloqueadores de los CCDV

El papel central de la alteración de la homeostasia de calcio en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y de otras demencias relacionadas con el envejecimiento está bien documentado (Mattson & Chan, 2001). Por tanto, la identificación de compuestos que combinen tanto un efecto de bloqueo moderado de los CCDV e inhibición de la ACE, sería interesante en el tratamiento de la EA (Villarroya *et al.*, 2004). La tacrina ha demostrado inhibir los CCDV en las células de la raíz del ganglio dorsal (Kelly *et al.*, 1991). Una serie de derivados de la tacrina, muestran actividad inhibidora de la ACE, butirilcolinesterasa (BUCE) y moduladores de los CCDV con potencialidades neuroprotectoras en la EA (de los Rios *et al.*, 2002; Marco *et al.*, 2004; Leon *et al.*, 2005; Marco-Contelles *et al.*, 2006a; Marco-Contelles *et al.*, 2006b; Marco-Contelles *et al.*, 2006c). De ahí que las alteraciones químicas de la estructura de la tacrina, cambiando el anillo de benceno con diferentes sustituyentes heterocíclicos, y alterando el tamaño del anillo de ciclohexano, haya proporcionado compuestos híbridos de las dihidropiridinas y tacrina, denominados tacipirinas, que son cuatro veces más potentes que la tacrina para inhibir la ACE (Marco-Contelles *et al.*, 2006b).

(3.5) *Ligandos quelantes de metales con propiedades adicionales*

La dishomeostasia cerebral de metales es otro factor claro que participa en la neuropatología de la EA. El quelante de metales clioquinol ha sido usado tanto in vitro como en modelos animales y en ensayos clínicos; por otra parte, se están desarrollando varios quelantes de metales con actividad terapéutica (White *et al.*, 2006). Sin embargo, la pobre especificidad de las dianas donde van a actuar y los problemas de seguridad de los agentes quelantes de metales disponibles en la actualidad, han limitado su uso clínico. El uso a largo plazo de estos agentes es probable que perturbe la homeostasia de muchos metales, así como las funciones fisiológicas normales de biomoléculas esenciales que requieren metales. Sin embargo, dentro del contexto de enfoque de LDMD, se ha revelado particularmente interesante el desarrollo de una nueva generación de agentes quelantes de metales. Estas moléculas tienen en su estructura un sitio que quela metales y dos sitios que quelan el A β y otros ligandos que además de quelar metales, también secuestran radicales libres (Dedeoglu *et al.*, 2004)

(3.6) *La memoquina, un ejemplo de compuesto plurifuncional*

Con el propósito de explorar la posibilidad de crear una molécula multifuncional que posea algunas de las actividades relevantes anteriormente citadas en el tratamiento de la EA, como la capacidad de inhibir la ACE, el procesamiento y agregación del A β , y de contrarrestar el estrés oxidativo, se ha desarrollado la memoquina (Figura 14) (Melchiorre *et al.*, 1998; Piazzzi *et al.*, 2003; Bolognesi *et al.*, 2005; Rosini *et al.*, 2005; Bolognesi *et al.*, 2006; Cavalli *et al.*, 2007).

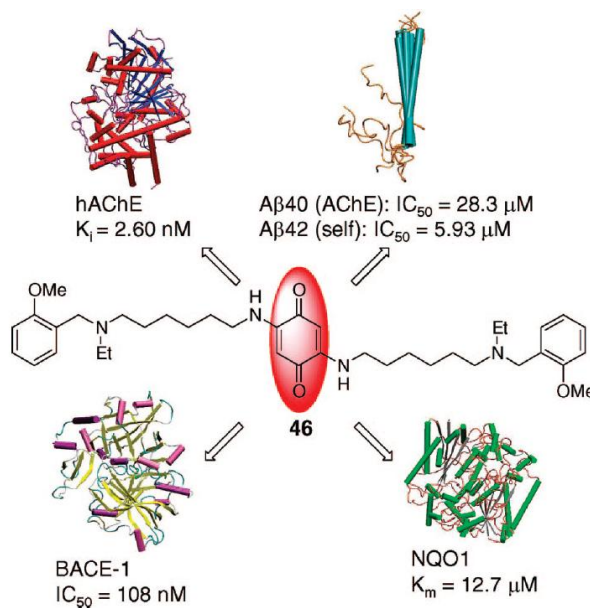


Figura 8 Ejemplo de un compuesto plurifuncional con potencialidad para tratar la enfermedad de Alzheimer: Estructura y dianas farmacológicas de la memoquina (IAChE, antioxidante, antiagregante de Aβ y anti- β-secretasa).

Las propiedades biológicas de la memoquina fueron ampliamente estudiadas para evaluar su potencial terapéutico tanto *in vitro* como *in vivo* como un LDMD para combatir la EA. En primer lugar, fueron sus propiedades antioxidantes, al neutralizar los radicales libres (Rice-Evans & Miller, 1994) y de actuar como un sustrato de la enzima NAD(P)H/quinona oxidoreductasa1 “NQO1” (Mordente *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; SantaCruz *et al.*, 2004). En segundo lugar, concentraciones nanomolares de la memoquina inhiben potencialmente la ACE humana, como también es capaz de inhibir la ACE inducida por la agregación de Aβ. En tercer lugar, este compuesto inhibe el autoensamblaje de Aβ42, que es el fragmento más amiloidogénico encontrado en las placas seniles en la EA. Finalmente, el perfil antiamiloidogénico de la memoquina ha sido estudiado y se ha visto su capacidad de actuar como inhibidor de la β-secretasa (Bolognesi *et al.*, 2009).

(3.7) Dimebona y la enfermedad de Alzheimer

La dimebona es una pequeña molécula (Figura 15), disponible para la administración oral, que había sido aprobada en Rusia como un antihistamínico no selectivo. Con el surgimiento de mejores antihistamínicos, la dimebona pasó

a ocupar un puesto secundario en la clínica. En la actualidad se ha descubierto que inhibe la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa, bloquea los receptores NMDA e inhibe la apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (Bachurin *et al.*, 2001; Lermontova *et al.*, 2001; Bachurin *et al.*, 2003; Grigorev *et al.*, 2003). Recientemente, la dimebona ha mostrado efectos neuroprotectores en modelos de alzheimer (Bachurin *et al.*, 2001) y de la EH. Estos hallazgos sugieren su pontencial utilidad en el tratamiento de la EA. En un ensayo clínico doble-ciego, placebo-controlado en fase II en 11 centros de ancianos en Rusia, en el que participaron 183 pacientes con la EA leve o moderada que duró 12 meses, se observó que los grupos que habían tomado dimebona presentaron mejoría cognitiva medida en la escala ADAS-Cog, indicando que la dimebona podría ser un compuesto del futuro en el tratamiento de la EA (Doody *et al.*, 2008). Desgraciadamente, algunos ensayos clínicos recientes en pacientes de alzheimer, no han proporcionado resultados positivos.

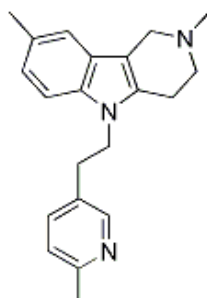


Figura 9 Estructura química de la dimebona, un antihistamínico ruso que quedó relegado por la aparición de antihistamínicos más eficaces que ha mostrado ser eficaz contra la EA en un ensayo clínico Fase II.

(4) Circulación mitocondrial del calcio y enfermedades neurodegenerativas

Entre los múltiples factores patogénicos de las enfermedades neurodegenerativas se encuentran la alteración de la homeostasia neuronal del calcio y un deterioro de la bioenergética mitocondrial. Esta relación se ha encontrado en la EA (Mattson, 2007), la enfermedad de Parkinson (Yao & Wood, 2009), la esclerosis lateral amiotrófica, ELA (Grosskreutz *et al.*, 2010) y

la enfermedad de Huntington (Quintanilla & Johnson, 2009). El deterioro de la función mitocondrial que se produce como consecuencia de ciertas mutaciones conduce a déficits bioenergéticos; ello hace más vulnerable a ciertas neuronas sometidas a estrés oxidativo u otros insultos vinculados a alteraciones de proteínas específicas como, por ejemplo, la proteína precursora del amiloide (PPA), el amiloide beta ($A\beta$) y la hiperfosforilación de tau en la EA; o la α -sinucleína en la EP o la SOD1 y TDP-43 en la ELA. La mitocondria desempeña una función que es vital para la regulación de la supervivencia o la muerte neuronal; de hecho, muchas de las proteínas específicamente implicadas en las formas genéticas de las enfermedades neurodegenerativas se localizan en la mitocondria, o en vías de señalización relacionadas con la muerte neuronal y la autofagia mitocondrial. No es extraño, pues, que las disfunciones mitocondriales sean una característica que comparten las enfermedades neurodegenerativas arriba mencionadas.

Por otra parte, también la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica son muy dependientes del aporte de energía y de la acumulación de mitocondrias en regiones sinápticas; a nivel postsináptico la actividad mediada por las vías de señalización conlleva el posicionamiento estratégico de las mitocondrias para asegurar el suministro de energía de acuerdo con la demanda, según sea el grado de la actividad neuronal (Macaskill *et al.*, 2009).

El fracaso de estos ajustes producirá alteraciones de la función sináptica con la consiguiente pérdida de neuronas. De hecho, la mitocondria se ha erigido en el centro de atención para el estudio de los complejos mecanismos que regulan la actividad de los canales iónicos y los transportadores que regulan, de modo sutil, las vías de señalización que controlan la función neuronal y la neurotoxicidad (Berridge *et al.*, 1998; Duchen, 2000; Garcia *et al.*, 2006).

(4.1) La circulación mitocondrial del calcio regula la bioenergética de la neurona

La circulación mitocondrial del Ca^{2+} se debe a la acción de dos transportadores específicos: la captación mitocondrial del Ca^{2+} se realiza por el uniportador, y

su posterior liberación al citosol se efectúa por la acción del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX). La demostración inicial de que la mitocondria podía liberar Ca^{2+} intercambiándolo por el Na^+ se hizo por Carafoli y col. en 1974, en mitocondrias aisladas de corazón. Más tarde, estos autores sugirieron que este intercambio podría servir para regular la circulación mitocondrial del Ca^{2+} (Crompton *et al.*, 1976; Carafoli, 2003). El descubrimiento del CGP37157 (CGP) como bloqueante del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX) fue importante para caracterizar el funcionamiento de dicho transportador (Chiesi *et al.*, 1988). La circulación mitocondrial del Ca^{2+} (mCC) sirve para mitigar los cambios bruscos de las concentraciones citosólicas del catión ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) que acontecen durante la actividad neuronal; de esta manera, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se mantiene en un nivel que es crítico para el buen funcionamiento de la neurona (Gunter & Pfeiffer, 1990; Rizzuto *et al.*, 1994; Montero *et al.*, 2000). Cuando se eleva crónicamente más allá de este nivel crítico, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se torna en una señal neurotóxica (Koike *et al.*, 1989; Franklin & Johnson, 1992).

El Ca^{2+} desempeña múltiples funciones fisiológicas y patológicas en la neurona. Por ejemplo, la elevación de la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) activa las dehidrogenasas del ciclo de Krebs (Duchen, 1992; McCormack & Denton, 1993; Jouaville *et al.*, 1999). Por otra parte, el sistema de alta capacidad para la captación de Ca^{2+} vía uniportador sirve para acoplar la demanda de energía al aumento de la producción de ATP (Jouaville *et al.*, 1999). Sin embargo, el aumento de la actividad mitocondrial que produce el exceso de Ca^{2+} ocasiona estrés oxidativo con el consiguiente aumento de la producción de radicales libres (Peng & Jou, 2010) que pueden inhibir enzimas importantes del ciclo de Krebs, caso de la α -glutarato dehidrogenasa (Lai & Cooper, 1986). Y lo que es más importante, la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} puede activar la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP), iniciando así la vía de señalización que conduce a la muerte neuronal por necrosis (Choi *et al.*, 1989; Stout *et al.*, 1998; Abramov & Duchen, 2008) o apoptosis (Bernardi *et al.*, 2006; Castaldo *et al.*, 2009).

(4.2) Algunos datos que apoyan la relación entre la modificación de la circulación del calcio mitocondrial y las enfermedades neurodegenerativas

La alteración de la actividad de la mCC puede iniciar la cascada de la apoptosis y producir neurodegeneración. Ello puede acontecer particularmente en las neuronas vulnerables que por sufrir una mutación, se hacen especialmente sensibles a la sobrecarga de Ca^{2+} y al estrés oxidativo. Esta relación tiene el apoyo de los siguientes hallazgos: (a) la expresión neuronal de la proteína PINK1 (asociada a la EP familiar), o la ablación del gen que la expresa, produce un deterioro de la actividad del mNCX; ello lleva a la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} , que sensibiliza la mitocondria y se abre el mPTP, deteriorando la respiración y provocando una mayor vulnerabilidad y muerte neuronal (Gandhi *et al.*, 2009); (b) el polimorfismo P86L del canal de calcio denominado CALHM1 (Calcium Homeostasis Modulator 1), que se ha asociado a la EA (Dreses-Werringloer *et al.*, 2008), altera la mCC (Moreno-Ortega *et al.*, 2010); (c) existe una deficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial hereditaria vinculada al ADN mitocondrial que cursa con una alteración de la mCC (Brini *et al.*, 1999).

Existen otros datos sobre alteraciones de la mCC inducidas farmacológicamente, que también cambian la sensibilidad mitocondrial de las células al estrés oxidativo y a otros agentes neurotóxicos. Los siguientes ejemplos son ilustrativos: (a) el péptido $\text{A}\beta$ se une al mPTP y aumenta la lesión mitocondrial inducida por Ca^{2+} (Du *et al.*, 2008); (b) la neuroprotección inducida por la dimebona se debe seguramente a una acción sobre el mPTP (Bachurin *et al.*, 2003); (c) por otra parte, la mitocondria se vuelve más resistente a la sobrecarga de Ca^{2+} cuando se encuentra en presencia de dimebona (Zhang *et al.*, 2010); (d) el CGP37157, un bloqueante del mNCX produce una elevación sostenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, aumentando así la actividad de las dehidrogenasas, la síntesis de ATP y la contracción del corazón (Cox & Matlib, 1993); (e) en un ratón transgénico modelo de ELA se encuentra afectado el mPTP (Martin *et al.*, 2009); y (f) ciertos compuestos con afinidad por el mPTP son eficaces en pacientes con miopatía asociada al colágeno VI (Merlini *et al.*, 2008).

(5) Hipótesis en la que se fundamenta esta tesis doctoral

Acabamos de ilustrar el hecho de que las manipulaciones genéticas y farmacológicas que modifican la velocidad de la mCC y la sensibilidad mitocondrial al Ca^{2+} , están muy relacionadas con la vulnerabilidad neuronal. Así pues, parece claro que el deterioro o el aumento de la función mitocondrial pueden, respectivamente, producir un aumento de muerte neuronal o favorecer la supervivencia de las neuronas vulnerables. La hipótesis de esta tesis doctoral surge de estas observaciones y plantea la posibilidad de modular farmacológicamente uno o más de los mecanismos implicados en la regulación de la velocidad de la circulación mitocondrial del calcio, por ejemplo el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial y el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. Esta tesis se centra fundamentalmente en someter a escrutinio la hipótesis de que el mNCX podría ser un buen blanco para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos neuroprotectores para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.

(6) Objetivos

La hipótesis que implica al mNCX como potencial diana neuroprotectora se ha explorado valiéndose de una herramienta farmacológica, el compuesto CGP37157 (CGP), un inhibidor de dicho transportador de Ca^{2+} . Aunque ampliamente utilizado para inhibir el transportador mNCX, el CGP afecta también a los canales de calcio dependientes del voltaje (CCDV). Por ello, hemos utilizado también en este estudio ciertas toxinas y fármacos que bloquean dichos canales. Así pues, planteo los objetivos de esta tesis de acuerdo con los artículos publicados o en preparación, siguiendo la secuencia siguiente:

- (1) Estudio de los efectos del CGP sobre la viabilidad de las células cromafines bovinas sometidas a un estrés por sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} (veratridina).
- (2) Estudio de los efectos del CGP sobre la viabilidad de las neuronas de rodajas de hipocampo de rata, sometidas a un estrés por sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} (veratridina).

(3) Estudio sobre la interacción del CGP y de los bloqueantes de canales de calcio en células cromafines.

De lograrse el establecimiento de la hipótesis, se daría pie para que los químicos del ITH sintetizaran nuevos compuestos con más selectividad y potencia para modular la actividad del mNCX, basándose en la estructura benzotiazepínica del CGP (Figura 10). Estos compuestos podrían ajustar la circulación mitocondrial del Ca^{2+} de tal manera que se garantizara la síntesis del ATP necesario para mantener viables las neuronas vulnerables de la EA, EP, ELA y EH. En teoría, estos nuevos fármacos podrían no solo mitigar los síntomas de alguna o varias de estas enfermedades neurodegenerativas; por su efecto neuroprotector salvando neuronas, podrían también enlentecer el curso de estas enfermedades.

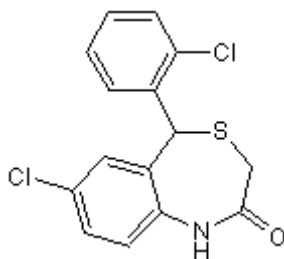


Figura 10 Estructura química del CGP37157 (CGP) ampliamente explorado como: (a) inhibidor selectivo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial en el corazón **Cox et al** (1993) J.Cardiovasc.Pharmacol. **21** 595; (b) regulador de la concentración de calcio intramitocondrial **Cox and Matlib** (1993) TiPS **14** 408; (c) acumulador de calcio en la mitocondria **White and Reynolds** (1997) J.Physiol. **498** 31; (d) modulador de la homeostasia de calcio mitocondrial **Baron and Thayer** (1997) Eur.J.Pharmacol. **340** 295.

(IV) MATERIALES Y MÉTODOS

(1) Estudios en células cromafines

(1.1) Cultivo de células cromafines bovinas

Las glándulas adrenales se obtuvieron de uno de los mataderos de Madrid bajo la supervisión del servicio veterinario local. Las células cromafines de la médula adrenal se aislaron como se describió previamente (Livett, 1984), con algunas modificaciones (Moro *et al.*, 1990; Moro *et al.*, 1991). Se utilizó el gradiente de Percoll para el procedimiento de aislamiento de células; por ello, en nuestros cultivos había una mezcla de células adrenérgicas (60-70%) y células noradrenérgicas (30-40%) (Gilabert *et al.*, 1999; Egea *et al.*, 2007a). Las células se suspendieron en DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal, 50 UI/ml de penicilina y 50 ug/ml de estreptomicina. Para la siembra, se utilizó DMEM conteniendo inhibidores de la proliferación celular (10 μ mol/L arabinósido de citosina, 10 μ mol/L fluorodeoxiuridina, y 10 μ mol/L leucina metil éster), para evitar el crecimiento excesivo de los fibroblastos y células endoteliales que podría enmascarar la medida de muerte de las células cromafines. La determinación total del número de células se llevó a cabo según el procedimiento descrito previamente (Wilson, 1987). Para estudios de muerte celular, las células se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de 24. El cultivo se mantuvo en el incubador a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. Para los tratamientos de células se utilizó DMEM libre de suero, pues el mismo interfiere con las mediciones de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

(1.2) Determinación de la actividad de la LDH

Se recogió el medio de las muestras a las 24 h de incubación expuestas a los diferentes tratamientos farmacológicos utilizados para determinar la LDH extracelular, una indicación de la muerte celular (Koh & Choi, 1987; Sobrado *et al.*, 2004). La actividad de la LDH se midió en las células (5×10^5 /pocillo) después del tratamiento con 10% de Tritón X-100 (LDH intracelular). Dicha

actividad se midió por espectrofotometría a 490-620 nm, utilizando un lector de microplacas (Labsystem iEMS reader MF; LabSystems, Helsinki, Finland). La actividad total de la LDH se define como la suma de las actividades intra y extracelulares. La LDH liberada se definió como el porcentaje de la extracelular en comparación con la actividad de la LDH total (Cano-Abad *et al.*, 1998).

(1.3) Medida de la viabilidad de las células cromafines con MTT

Para determinar las células viables se utilizó la prueba colorimétrica de MTT (formazan preparado a la concentración de 5 mg/ml). Las células se sembraron a la densidad de 5×10^5 en placas de 24 pocillos manteniéndose en el incubador a 37°C durante 48 h. Después de este tiempo, las células se trataron con CGP, CGP + veratridina o solamente veratridina durante 24 h. Luego, se añadió 50 µl de la solución de MTT formazán a cada pocillo y las células se incubaron durante 3 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo y con todo cuidado se retiró la solución en cada pocillo, reemplazándola con 500 µl de DMSO y agitándola durante 1 h. Finalmente tomamos 100 µl de alícuota de cada pocillo y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un lector de microplacas (Labsystem iEMS reader MF; LabSystems, Helsinki, Finland).

(1.4) Medida de ROS

Para medir la producción celular de especies reactivas de oxígeno (ROS), se utilizó la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (Ha *et al.*, 1997). Las células cromafines bovinas sembradas a la densidad de 5×10^5 /pocillo en placas de 24, se mantuvieron en el incubador a 37°C durante 2 días. Luego se trataron durante 3 h con CGP, CGP + veratridina o solamente veratridina; después las células se cargaron con 5 µM de CM-H₂DCFDA durante 30 minutos a 37°C. La sonda CM-H₂DCFDA atraviesa la membrana celular y se hidroliza por las esterasas intracelulares a la forma no fluorescente diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF); este último compuesto reacciona con el H₂O₂ intracelular para formar diclorofluoresceína (DCF), de color verde fluorescente. La fluorescencia se

midió en un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300; Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, Netherlands).

(1.5) Medición del potencial de membrana mitocondrial

Las células cromafines se sembraron a la densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos durante 2 días. Las células se trataron con CGP, veratridina, y CGP + veratridina durante 3 h en un incubador a 37°C. Luego, las células se cargaron con 5 μ M de la sonda JC-1 durante 30 min a 37°C. La fluorescencia se midió utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300; Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, Netherlands). La sonda JC-1 exhibe una acumulación en la mitocondria dependiente del potencial, indicado por la emisión de cambio de la fluorescencia verde (529 nm) al rojo (590 nm). En consecuencia, las mitocondrias despolarizadas se caracterizan por un incremento en la proporción de intensidad de la fluorescencia roja/verde. El cambio del color sensible al potencial se debe a la formación de J-agregados rojo fluorescentes, dependientes de la concentración (Smiley *et al.*, 1991).

(1.6) Medición de los niveles del citocromo c en células cromafines bovinas

Las células se sembraron a la densidad 1×10^6 /pocillo en placas de 6 mantenidas en un incubador durante 2 días a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. Después de este tiempo, las células se trataron con veratridina, CGP y veratridina+CGP durante 3 h. Las células se colectaron y suspendieron a la concentración de 5×10^6 células/ml con tampón-1 frío (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M sacarosa, 10 μ M aprotinina A, 10 μ M leupeptina, 1 mM PMSF). La suspensión celular se homogenizó 5 a 10 veces en hielo, y posteriormente se centrifugó a 10.000xg durante 1 h a 4°C. El sobrenadante se utilizó como fracción citosólica. El precipitado se resuspendió con tampón-2 frío (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 μ M aprotinina A, 10 μ M leupeptina, 1 mM PMSF); la suspensión se sonicó tres veces en el

hielo, se centrifugó a 10.000xg durante 30 minutos a 4°C, y el sobrenadante se utilizó como fracción mitocondrial. Por último se añadió 100 µl de muestra de cada fracción a la placa recubierta de anticuerpos (Kluck *et al.*, 1997).

Una recubierta de anticuerpos monoclonales anti-citocromo c se adsorbe sobre la placa de microtitulación. El citocromo c presente en la muestra se une a los anticuerpos adsorbidos en la placa; un anticuerpo biotina-conjugada anti-citocromo c monoclonal se añadió y se une a la citocromo c capturado por el primer anticuerpo. Después de la incubación, la no unida biotina-conjugada anti-citocromo c se retiró durante la etapa de lavado. Se añadió la estreptavidina-HRP que se une a la biotina-conjugada anti-citocromo c. A continuación, la estreptavidina-HRP no unida se eliminó durante la etapa de lavado, y la solución sustrato reaccionó con HRP añadido a los pocillos (Narita *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999). Se formó así un producto colorado en proporción a la cantidad de citocromo c presente en la muestra. La reacción se dio por concluida mediante la adición de ácido y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (Labsystems iEMS reader MF; Labsystems, Helsinki, Finland).

(1.7) Registros de corrientes y adquisición de datos

Las corrientes de sodio (I_{Na}) se registraron utilizando la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera (Hamill *et al.*, 1981). Los registros de células enteras se llevaron a cabo con electrodo pulido al fuego, con una resistencia de 2-5 MΩ relleno con una solución intracelular (en mM): 160 Cs-metanosulfonato, 10 etilenglicol-bis (β-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacetico (EGTA), 5 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 10 HEPES / CsOH (pH 7.3).

Las corrientes de calcio (I_{Ca}) se registraron utilizando la técnica de patch-clamp en configuración de parche perforado (Korn & Horn, 1989; Gillis *et al.*, 1991). Para facilitar el sellado, la pipeta de patch de vidrio borosilicato pulido al fuego (Kimax 51, Witz Scientific, Holland, OH), se sumergió en un vaso con solución intracelular (en mM): 9 NaCl, 145 Cs-glutamato, 1 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7.3 con CsOH) y luego se volvió a rellenar con la misma solución conteniendo

anfotericina B (50 $\mu\text{g/ml}$). La anfotericina B se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) y se almacenó a -20°C en alícuotas de 50 mg/ml. Se preparó una pipeta con solución fresca cada 2 h. El registro se inició cuando la resistencia de acceso disminuyó por debajo de 25 $\text{M}\Omega$, que suele ocurrir dentro de los 10 minutos después del sellado (Rae *et al.*, 1991).

Los electrodos se montaron en el cabezal del amplificador de patch-clamp EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania), que permite la cancelación de los transientes capacitativos y la compensación de las resistencias en serie. Los datos se adquirieron con una muestra de frecuencia que oscila entre el 5 y 20 kHz, filtrada a 1-2 kHz. Se descartaron los registros de trazados con corrientes de fuga >25 pA o resistencias en serie >25 $\text{M}\Omega$. Las células cromafines bovinas se colocaron en una cámara experimental montada en la pletina de un microscopio invertido Nikon eclipse T2000 o un Kikon diaphot. Durante la preparación del sello con la pipeta de patch, la cámara se bañó con una solución que contenía el Tyrode control (en mM): 137 NaCl, 5.3 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 y 10 HEPES (pH 7.4 con NaOH). Una vez roto el parche de la membrana y establecida la técnica de patch-clamp en configuración de célula entera, la célula se perfunde rápida y continuamente con solución extracelular de composición idéntica a la cámara de solución (véanse los resultados de los protocolos experimentales específicos). Las soluciones extracelulares (conteniendo 1 μM TTX y ausencia de CaCl_2 cuando se registró I_{Na}) se intercambiaron rápidamente utilizando pequeñas válvulas solenoides impulsadas electrónicamente, acopladas a un dispositivo de varias vías. El sistema común de salida de la perfusión se colocó a una distancia de 100 μm de la célula en estudio. La velocidad de flujo fue regulada (1 ml/min) por gravedad para conseguir la sustitución completa del líquido pericelular en unos 200 ms. Los datos se adquirieron mediante el uso del programa en PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). El análisis de los datos se realizó con Igor Pro (Wavemetrics, Oregon, EE.UU.) y mediante, programas de PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($22-24^{\circ}\text{C}$) en células de 2-4 días en el cultivo.

(1.8) Medición de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$

Las células cromafines se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina a la densidad de 2×10^5 células y mantenido en un incubador durante 3 días a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. Después de este tiempo, las células se cargaron con 3 μ M fluo-4 AM y ácido plurónico disueltos en una solución estándar de Tyrode con la siguiente composición (en mM): 137 NaCl; 10 HEPES; 5.3 KCl; 1 MgCl₂; 2 CaCl₂, pH 7.4 durante 45 minutos en un incubador. Después de este tiempo, los cubres se lavaron dos veces y se dejaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que las esterasas citoplasmáticas separen el Fluo-4 libre del grupo AM, por lo que la molécula activa quela Ca^{2+} y fluoresce. Por último, los cubres que contenían las células se colocaron en una cámara experimental montada sobre la pletina de un microscopio invertido NIKON TMD con un objetivo de inmersión en aceite (Nikon 60xPlanApo, n.a. 1.4) y una unidad confocal de escaneo láser (MRC 1024; BIO-RAD), equipado con un Ar/Kr láser capaz de producir un haz de luz de 488 nm de longitud de onda. La cámara se perfundió continuamente con Tyrode. La célula se perfunde continuamente con la solución extracelular, de composición idéntica a la de la cámara de solución. Las soluciones externas se intercambian rápidamente utilizando válvulas acopladas a un dispositivo de sujeción de varias vías de perfusión. En cada experimento se seleccionaba la región de interés que limita el conjunto de células y otra fuera de ésta para registrar posibles cambios de fondo. Los registros de fluorescencia se inician automáticamente por un disparador activado por un amplificador de patch-clamp para mejor sincronizar los registros.

(2) Estudios en rodajas de hipocampo

(2.1) Preparación de rodajas de hipocampo de cerebro de ratas Sprague Dawley

Los experimentos se realizaron en rodajas de hipocampo de ratas Sprague-Dawley de 2 meses de edad y entre 275-325 g de peso, procedentes de una

colonia de nuestro animalario. Se manipularon de acuerdo a la directiva publicada por la Unión Europea para estos fines y así como las normas aprobadas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Se tomaron todas las medidas posibles para reducir al mínimo el número de animales y su sufrimiento.

Se utilizó el protocolo de Egea et al., (2007b) para preparar las rodajas. Los animales fueron anestesiados profundamente por inyección i.p. con pentobarbital sódico (60 mg/Kg), decapitados, y cada cerebro se aisló rápidamente del cráneo y se colocó en el tampón de disección fría de Krebs-bicarbonato que contiene (en mM): NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 10, KH₂PO₄ 1.18, glucosa 11 y sacarosa 200. Todas las soluciones se burbujearon previamente con la mezcla de gases 95% de O₂/5% de CO₂, por lo menos 45 minutos antes de la inmersión de los hipocampos, para garantizar la saturación de O₂ y un pH final de 7,4. Los hipocampos se disecaron transversalmente en rodajas de 350 nm de espesor con el equipo chopper para hacer cortes de tejidos. Se descartaron las tres rodajas de las porciones anteriores y posteriores de los hipocampos por ser muy pequeñas y no tener el mismo tamaño, mientras que el resto se trasladaron a un vial que contiene 3 ml de solución pre incubación de Krebs-bicarbonato que contiene (en mM): NaCl 120, KCl 2, NaHCO₃ 26, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.19 , glucosa 11 y se burbujearon con carbógeno a temperatura ambiente durante 30 min a 34°C para recuperarse del trauma de los cortes; después de este tiempo, se retiró la solución de preincubación Krebs-bicarbonato y se adicionaron 3 ml de solución control de Krebs-bicarbonato que contiene (en mM): NaCl 120 , KCl 2, NaHCO₃ 26, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.19, glucosa 11, y se burbujearon con carbógeno durante 30 min a 37°C. Las rodajas se protegieron del burbujeo vigoroso mediante el uso de una malla semipermeable de nylon.

(2.2) Protocolos experimentales

Finalizado el periodo de incubación de 30 min a 37°C, las rodajas se transfieren en grupos de 4 por pocillo en placa de 6 pocillos que contienen 1 ml de solución control (cuya composición se describió más arriba) y 1 ml de DMEM.

Luego, las rodajas se incuban durante 30 minutos con los diferentes fármacos, seguido de coincubación con veratridina durante 3.5 h, siempre a 37°C. Al final de este período, la viabilidad neuronal se estimó con el método de reducción de MTT; también se cuantificó en otros experimentos la producción de ROS.

(2.3) Medición de la reducción de MTT para estimar la viabilidad neuronal al final de cada experimento

Al final de cada experimento realizado, como se describe en la sección anterior, la viabilidad celular se determinó con la prueba colorimétrica del azul formazán MTT, que se preparó a la concentración de 0,5 mg/ml. Para finalizar el experimento, cada rodaja individual se transfirió desde el pocillo de la placa de 6 pocillos que contiene 4 rodajas por pocillo, a un pocillo de la placa transparente de 96 pocillos que contiene 200 µl de la solución MTT 0.5 mg/ml y se incuban durante 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y se adicionó 200 µl DMSO a cada pocillo que contiene la rodaja; la placa se dejó bajo agitación continua durante 5-10 min para homogenizar la solución. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm, utilizando un lector de microplacas (IEM reader MF; Thermo Fisher Scientific).

(2.4) Determinación de la producción de ROS en rodajas de hipocampo de rata sometidas al estrés de veratridina

Al final del experimento, cada rodaja se trasladó a un pocillo en placa de 24 pocillos que contiene 250 µl de solución control de Krebs-bicarbonato oxigenado (cuya composición se describió más arriba) y 250 µl de DMEM, en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. De este modo, cada rodaja individual se incubó con 100 µM de la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (Ha *et al.*, 1997) durante 30 min a 37°C. Esta sonda atraviesa la membrana celular y se hidroliza por las esterasas intracelulares a la forma no fluorescente, diclorodihidrofluoresceína; esta última reacciona con H₂O₂ intracelular para formar diclorofluoresceína, un colorante fluorescente verde. La fluorescencia se

midió en un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon eclipse TE300; Nikon Instruments Europa, Badhoevedorps, The Netherlands).

(2.5) Determinación de proteínas por western blott

Se utilizaron rodajas de hipocampo de rata Sprague Dawley; el procedimiento es el mismo al descrito en el apartado anterior, hasta la incubación durante 4 horas; pasado ese tiempo, las rodajas se disgregan con la ayuda de una pipeta Pasteur, los 2 ml se transfieren a tubos falcon de 15 ml con la ayuda del agitador para romper y homogenizar mejor la solución. Se centrifuga a 800 rpm durante 10 min, se elimina el sobrenadante y se añade 100 μ l Akt/lisis se homogeniza bien entre 3 a 5 veces con intervalos de 10 a 15 min con la ayuda del agitador, manteniendo los falcons en hielo. Se colocan los 100 μ l en un eppendorf de 1000 μ l y se centrifuga a 13000 rpm durante 2 min a 4°C, se recoge el sobrenadante y se congela a -80°C; estos extractos se utilizaron ulteriormente para la determinación de fosfo p38 o la p38 total (ver Resultados y Discusión).

(3) Análisis de datos y estadística

Los datos se ofrecen como medias \pm EE, las diferencias entre grupos se determinaron mediante la aplicación de un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls. Cuando estaba indicado, se utilizó el test *t-Student* para determinar la significación estadística entre las medias de dos conjuntos de datos homogéneos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

(V) RESULTADOS

(1) Experimentos realizados con CGP37157 en células cromafines para explorar la hipótesis del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial como diana para la neuroprotección farmacológica (artículo N° 1)

(1.1) Características de los efectos citotóxicos de veratridina

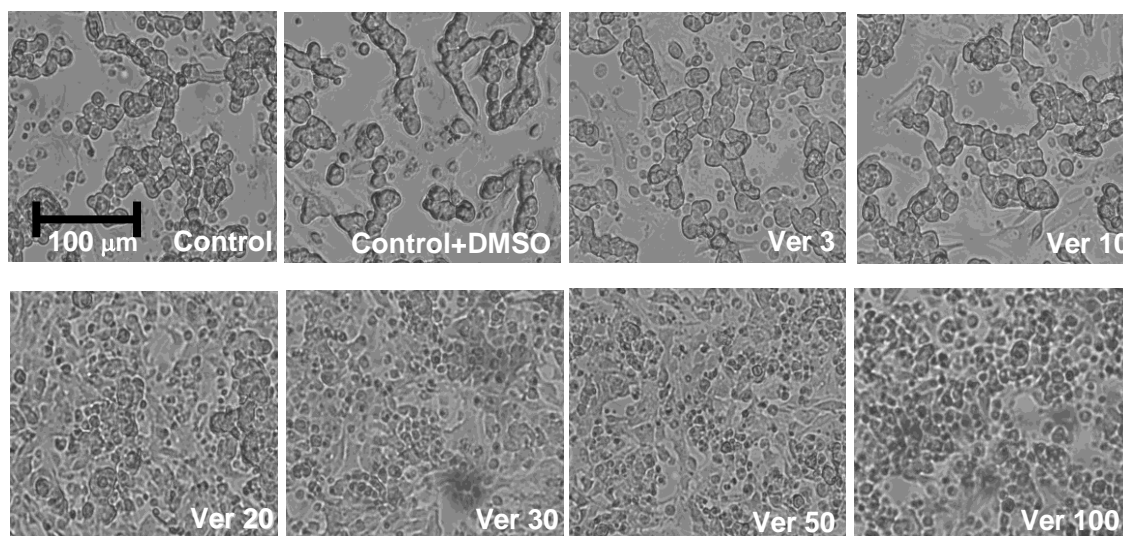
Hemos realizado estos primeros experimentos para caracterizar la lesión producida por la veratridina en las células cromafines. En los experimentos de la Figura 11, las células se expusieron a concentraciones crecientes de veratridina en DMEM libre de suero y mantenidas en el incubador a 37°C durante 24 h. El hecho de retirar el suero durante las 24 h de exposición a veratridina se debe a la observación de que el suero interfiere con la determinación de la LDH liberada al medio DMEM. El panel A muestra las microfotografías en contraste de fases tomadas después de un período de incubación de 24 h; las células control adoptan típicas disposiciones en racimos, aunque el contorno celular es también visible. Las células muestran una intensa birrefringencia y sus membranas plasmáticas están bien definidas, con un citosol homogéneo. Las células tratadas con veratridina muestran un deterioro progresivo dependiente de la concentración; por lo tanto, las células se fusionaron, perdieron su birrefringencia, los contornos ya son irregulares, y el citosol presenta una morfología granular.

Estos signos morfológicos se correlacionan con el parámetro bioquímico utilizado aquí para cuantificar los daños y la muerte celular, es decir, la actividad de la LDH liberada después de un período de 24 horas de incubación con diferentes tratamientos. La LDH liberada se expresó en términos relativos como el % del total de la LDH presente en células intactas y en el medio de incubación al final de las 24 h de tratamiento.

La Figura 11B muestra que la LDH basal liberada en las células controles durante la incubación durante 24 h en DMEM fue de aproximadamente un 5%. Cuando la LDH basal liberada fuese superior al 10% el experimento era

descartado. La concentración más alta utilizada (0,1%), DMSO aumentó la LDH basal liberada a un 10%. Esta concentración se utilizó porque la solución máxima de veratridina es 100 μ M, que contiene 0.1% de DMSO; el 0,05% de concentración de DMSO utilizado en los experimentos sucesivos no aumentó la basal de la LDH liberada.

A



B

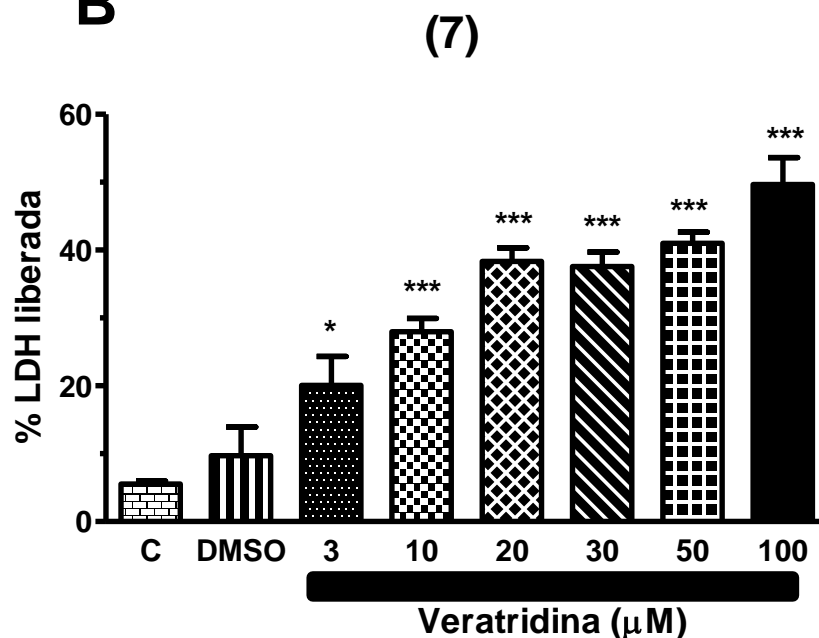


Figura 11. La veratridina (Ver) causó la muerte de las células cromafines de forma dependiente de concentración. **A** Microfotografía de contraste de fases de las células expuestas al vehículo o al aumento de las concentraciones de Ver durante 24 h en DMEM (números en la abscisa de cada panel representado en μ M). **B**, Ver induce la liberación del lactato deshidrogenasa (LDH) que se midió al final del período de incubación de 24 horas. La muerte de las células se expresa como % del total de la LDH

(suma de la LDH presente en las células y la LDH presente en el medio) (ordenada). DMSO, la LDH liberada a partir de células incubadas con la máxima concentración del DMSO usado como solvente para la concentración Ver 100 μ M (0,1%). Los datos son medias \pm S.E.M. de 7 de experimentos realizados en triplicado en células de 7 cultivos diferentes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, comparación con el control (C).

La veratridina aumenta la LDH liberada de forma dependiente de la concentración. A 3 μ M, se liberó al medio el 20% de la LDH total y a 20-30 μ M se produjo un máximo de 40% de liberación (Figura 11B). La CE_{50} fue aproximadamente de 10 μ M para la muerte celular inducida por la veratridina. Por ello, se seleccionó la concentración 30 μ M de veratridina para los experimentos siguientes, por haber causado un daño celular reproducible.

(1.2) El CGP protege las células frente a los efectos citotóxicos de veratridina

Para bloquear el mNCX se utilizó como herramienta farmacológica el CGP. Por lo tanto, primero estudiamos el efecto de CGP por sí solo sobre las células cromafines. Concentraciones de CGP en el rango 0.3-30 μ M no aumentaron la LDH liberada por encima de la basal (alrededor del 5%) durante las 24 horas de incubación. Sin embargo, a 100 μ M el CGP por sí mismo muestra un marcado efecto citotóxico (alrededor del 75% de la LDH liberada) (Figura 12A). En consecuencia, no se utilizó esta última concentración en los experimentos de citoprotección frente a veratridina.

La Figura 12B muestra los efectos citoprotectores con el aumento de la concentración de CGP, que se han añadido a distintos pocillos de la misma placa 30 minutos antes de añadirse 30 μ M de veratridina; tanto la veratridina como cada concentración de CGP quedaron en contacto con las células por un período de 23.5 h. La concentración umbral que ofrece una protección significativa es de 5 μ M, observándose una protección máxima a 20-30 μ M.

Se realizó un protocolo similar pero midiendo la viabilidad celular con MTT, un indicador de la función mitocondrial y de células viables. A 30 μ M, la veratridina causó cerca del 40% de pérdida celular, una cifra similar a la obtenida con la LDH. A 3 μ M, el CGP produjo una recuperación significativa de la viabilidad

celular (Figura 12C). Las elevadas concentraciones de CGP aumentaron gradualmente la viabilidad celular. Por lo tanto, hemos encontrado una buena correlación cuando medimos la muerte celular con la LDH liberada o la supervivencia celular con MTT; sin embargo, con MTT, el CGP ofrece una protección significativa a concentraciones más bajas (es decir, 3 μ M) que aquellas observadas cuando se ha usado la liberación de LDH como un marcador de daño celular. Esto puede explicarse por el hecho de que durante la exposición a veratridina, primero se dañan las mitocondrias y seguidamente se produce la muerte celular en función de la LDH liberada, que tiene lugar en etapas posteriores, cuando la membrana citoplasmática está dañada.

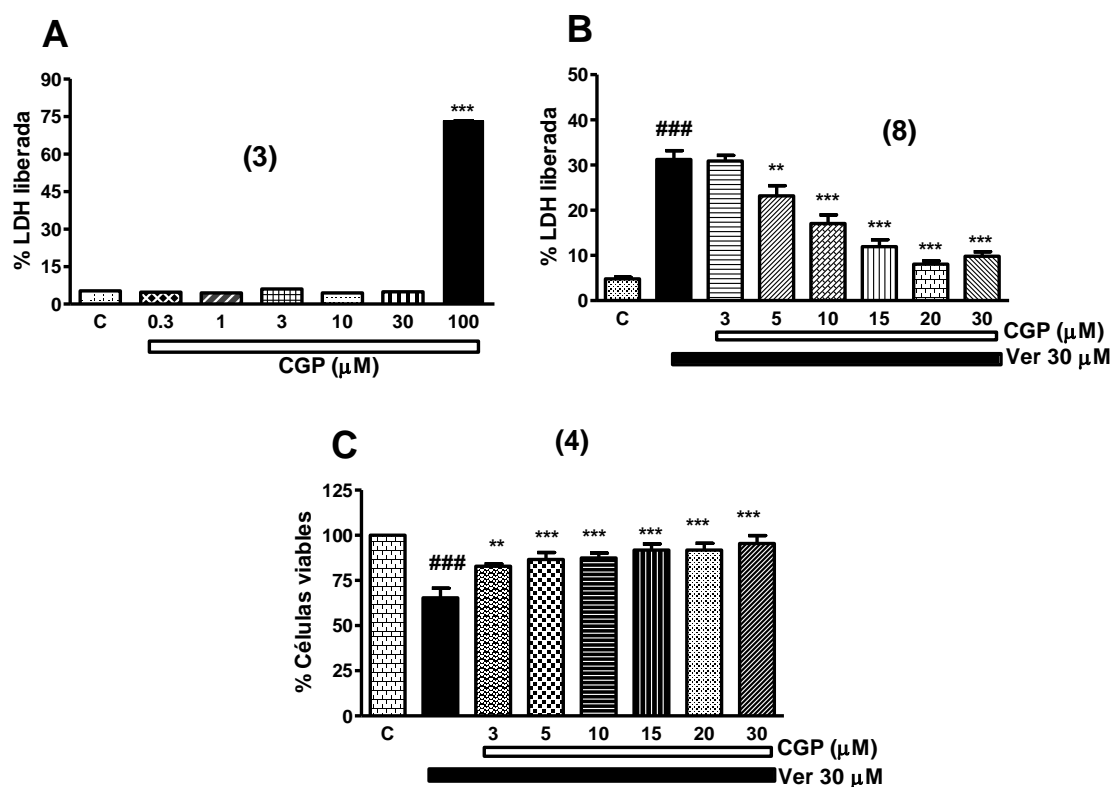


Figura 12. Protección por CGP37157 (CGP) contra los efectos citotóxicos de veratridina (Ver). **A**, células incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de CGP; Control (C), sin adición de compuestos. **B**, las células se incubaron con CGP primero durante 30 minutos seguida de una incubación de 23.5 h con CGP combinado (en las concentraciones que se indican en la abscisa) y Ver (a 30 μ M en todos los casos). **C**, las células se incubaron inicialmente durante 30 minutos (en la concentración que se muestra en el eje de abscisa), seguido de un período de incubación de 23.5 h con la combinación CGP y Ver (a 30 μ M en todos los casos). En los paneles **A** y **B**, la muerte celular se siguió por la medición en placas independientes, la LDH presente en el medio y en las células al final del período de incubación de 24 horas; estos dos parámetros se añadieron para dar el 100%, o total de la LDH. La LDH liberada (ordenadas) producida por cada tratamiento se expresó como % de la LDH total. **C**, la viabilidad celular se midió al final del experimento utilizando la prueba colorimétrica de MTT, un indicador del estado funcional de la mitocondria (véase Métodos). Los datos son medias \pm S.E.M. del número de los experimentos en

triplicado que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en un cultivo celular. ***p<0.001, con respecto al control (C) (panel A); ###p<0.001, con respecto al Control (C) (paneles **B**, **C**), **p<0.01, ***p<0.001, con respecto solamente a Ver (columnas negras) (paneles **B**, **C**).

La concentración de 30 μ M de CGP ofrece una drástica citoprotección tanto con la LDH como con MTT; por ello se ha seleccionado para llevar a cabo varios de los siguientes experimentos. El primer protocolo utilizado consistía en la preincubación de células con 30 μ M de CGP durante diferentes períodos de tiempo; el CGP se retiró posteriormente y luego se adicionó veratridina inmediatamente y se mantuvo por el resto del período de 24 h. Los resultados de dicho experimento se muestran en la Figura 13A. Es interesante que, con sólo 1 minuto de pre-incubación, el CGP ya ofrece una protección significativa. Este efecto aumenta gradualmente con el aumento del tiempo de incubación, hasta 45 min. Se realizó un experimento similar al anterior, con la diferencia de que después de periodos de pre-incubación con CGP, la adición de la veratridina se ha precedido con 3 min de lavado; de esta manera, es poco probable que se mantuviese en el medio celular el CGP. La Figura 13B muestra que en estas condiciones, el CGP todavía ofrece una protección significativa que fue una vez más dependiente de la duración del período de pre-incubación. Las células controles se trataron también en paralelo a las pre-incubadas con CGP durante el mismo rango de tiempo (1-45 min), pero el CGP fue también co-incubado con veratridina durante el resto de las 24 h. Obviamente, en estas condiciones, el CGP ofrece la máxima citoprotección independientemente de la duración del período de pre-incubación (Figura 13C).

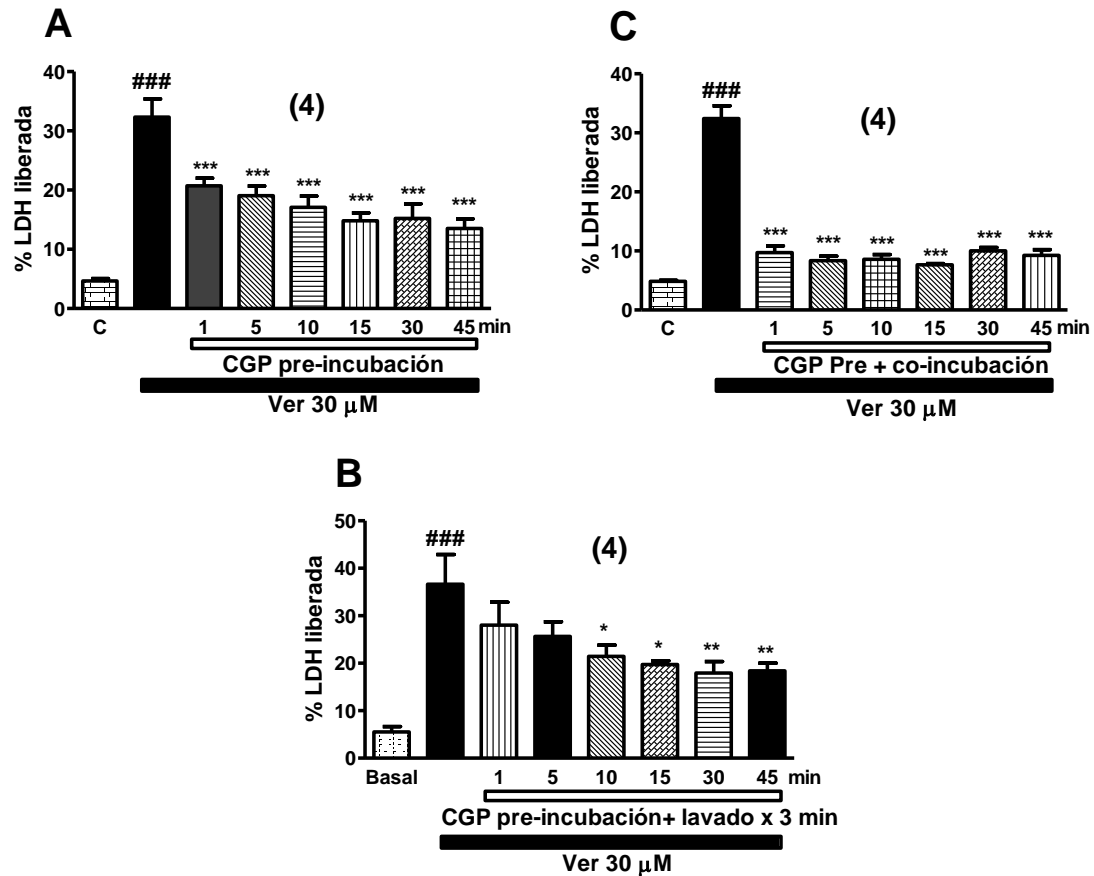


Figura 13. La citoprotección mostrada por CGP37157 (CGP) tiene “memoria”. **A**, las células se preincubaron durante el tiempo indicado (en la parte inferior barra horizontal) con 30 μ M CGP; a continuación, se lavó el CGP y un nuevo DMEM conteniendo 30 μ M veratridina (Ver) se adicionó y se mantuvo a lo largo de 24 h. **B**, las células se pre-incubaron durante el tiempo indicado con 30 μ M CGP; el CGP se lavó en un intervalo de 3 minutos (con DMEM fresco) antes de la adición de Ver. **C**, las células se preincubaron durante el tiempo indicado con 30 μ M CGP; a continuación la solución se reemplazó por un DMEM nuevo que contenía CGP+Ver. En todos los experimentos, la LDH liberada (ordenadas) se midió después de las 24 h de incubación con Ver. Los datos son medias \pm S.E.M. del número de experimentos en triplicado que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en diferentes cultivos de células. ^{###} $p < 0.001$, con respecto a la basal o control, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$; ^{***} $p < 0.001$, con respecto a solamente a Ver (columnas negras).

En resumen, (1) el CGP se comporta como un eficaz compuesto citoprotector frente a la muerte de células cromafines inducida por veratridina; (2) el CGP es más eficaz cuando se añade 30 minutos antes, y se mantiene en el medio durante la incubación con veratridina; (3) la pre-incubación seguida de lavado del CGP conserva en parte sus propiedades citoprotectoras, como si esta propiedad tuviera algún tipo de memoria; (4) a 100 μ M, el CGP exhibe un marcado efecto citotóxico por sí mismo; por lo tanto, esta concentración no se utilizó en los restantes experimentos.

(1.3) Efectos del CGP sobre la viabilidad celular cuando se utilizan estímulos citotóxicos distintos de veratridina

La veratridina es una herramienta farmacológica bien establecida para inducir la muerte celular en las neuronas y en células cromafines a través de un mecanismo vinculado a la sobrecarga celular de Na^+ y Ca^{2+} . Por lo tanto, parecía interesante estudiar si el CGP tiene efectos citoprotectores sobre otros modelos de toxicidad celular. Previamente se había desarrollado otro modelo de muerte de células cromafines a través de sobrecarga de Ca^{2+} , mediante el uso de FPL64176 (FPL) un activador de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo *L*, una ligera despolarización con K^+ (30 mM), y alta $[\text{Ca}^{2+}]_e$. En este modelo, la muerte celular se obtuvo por una mayor entrada de Ca^{2+} a través de los canales de tipo *L*, ya que el nimodipino ofrece una completa protección (Cano-Abad *et al.*, 2001). Por lo tanto, probamos si como acontece con el nimodipino, el CGP protege las células cromafines contra los efectos citotóxicos de $30\text{K}^+/\text{FPL}$. Estos experimentos se realizaron en una solución de Krebs-HEPES que permite una mejor manipulación iónica (Maroto *et al.*, 1994; Cano-Abad *et al.*, 2001). Se logra así una gran liberación de LDH basal al utilizar 5 mM de Ca^{2+} en lugar de 2 mM de Ca^{2+} (Figura 14A y B).

La Figura 14A muestra que las células incubadas con solución $30\text{K}^+/\text{FPL}$ las 24 h produce un 30% de LDH liberada, una cifra similar a la obtenida en nuestros experimentos anteriores (Cano-Abad *et al.*, 2001). Cuando las células se preincubaron con concentraciones crecientes de CGP seguido de incubación con CGP más $30\text{K}^+/\text{FPL}$, el CGP causa un claro efecto citoprotector dependiente de concentración. Se estima que para este efecto la CE_{50} fue de 10 μM , similar a la obtenida al utilizar veratridina como agente citotóxico. Cuando se utiliza 5 mM Ca^{2+} , el CGP también ofrece una protección significativa a 15-30 μM (Figura 14B).

Recurrimos al segundo estímulo citotóxico no relacionado con los canales *L*, es decir, bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial con la combinación de 10 μM oligomicina que inhibe el complejo V con 30 μM rotenona que bloquea el

complejo I (Olig/Rot). En un estudio reciente se observó que la incubación de las células cromafines bovinas con Olig/Rot durante 24 horas producía una liberación de LDH entre 35 y 45% (Egea *et al.*, 2007a), una señal de muerte celular similar a la observada en nuestros experimentos presentes con veratridina (Figura 11B). En el experimento de la Figura 14C, 24 h de incubación con Olig/Rot causó cerca de 30% de liberación de LDH. En presencia de concentraciones crecientes de CGP (añadido 30 minutos antes y durante la incubación de células con Olig/Rot), la LDH liberada no cambió a 3-10 μM . A concentraciones más altas, el CGP aumenta la lesión celular producida por Olig/Rot (cerca de 50% de la LDH liberada a 30 μM). Por lo tanto, parece que el CGP sólo ofrece protección contra aquellos estímulos citotóxicos en que interviene la sobrecarga celular de Ca^{2+} .

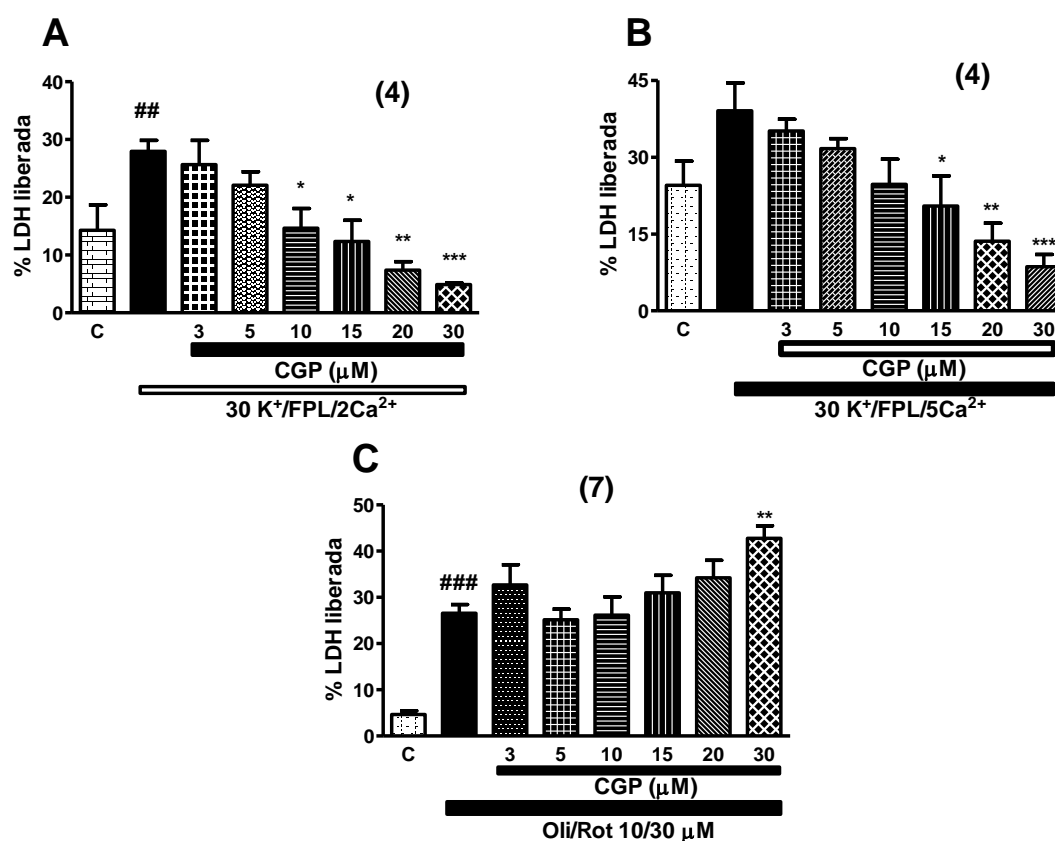


Figura 14. Efectos de CGP37157 (CGP) sobre los efectos citotóxicos de FPL64176 (FPL), y la combinación oligomicina más rotenona. **A**, las células se incubaron durante 30 minutos con las concentraciones de CGP indicadas en el eje de abscisas; a continuación, el medio se cambió por otro que contenía concentraciones CGP+30 mM K⁺, 0.3 μM FPL, y 2 mM de Ca²⁺ (30K⁺/FPL/2Ca²⁺), y las células se incubaron adicionalmente durante un período de 23.5 horas antes de la medición de la LDH liberada (ordenada). **B**, las células se incubaron durante 30 minutos con las concentraciones de CGP que se muestran en el eje de abscisas; a continuación, el medio se cambió por otro que contenía las

concentraciones CGP+30 mM K⁺, 0.3 μM FPL, y 5 mM de Ca²⁺ (30K⁺/FPL/5Ca²⁺). **C**, protocolo experimental como en A, pero aquí se utilizaron 10 μM oligomicina y 30 μM rotenona (Olig/Rot) como agentes citotóxicos. Los datos son medias ± S.E.M. de experimentos en paréntesis por triplicado; cada experimento se realizó con células procedentes de diferentes cultivos celulares. ##p<0.01; ###p<0.001, con respecto al control (C, **p<0.01, con respecto al agente citotóxico solamente (columnas negras).

(1.4) Efectos de veratridina y CGP sobre la función mitocondrial

Puesto que la posible diana de CGP es el mNCX, pareció conveniente estudiar si la veratridina afecta la función mitocondrial y cómo protege el CGP contra este tipo de lesión. Se han estudiado tres de estas funciones, es decir, la producción de ROS, el potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c. La Figura 15A muestra una microfotografía fluorescente de células que previamente habían sido tratadas durante 3 h con vehículo (control), 30 μM veratridina, 30 μM CGP o la combinación de veratridina más CGP; posteriormente se cargaron con la sonda fluorescente H₂DCFDA. Se observa claramente el aumento de la fluorescencia en las células tratadas con veratridina, una indicación de la acumulación de ROS (Ha *et al.*, 1997). También es notorio cómo el CGP no afecta por sí mismo la fluorescencia basal, pero bloquea totalmente el aumento de ROS producido por veratridina. Esto se ve mejor en la Figura 15B que representa la media de fluorescencia de 190 células de 3 cultivos diferentes. La veratridina aumenta 2.5 veces la acumulación de ROS, un efecto que fue impedido por el CGP.

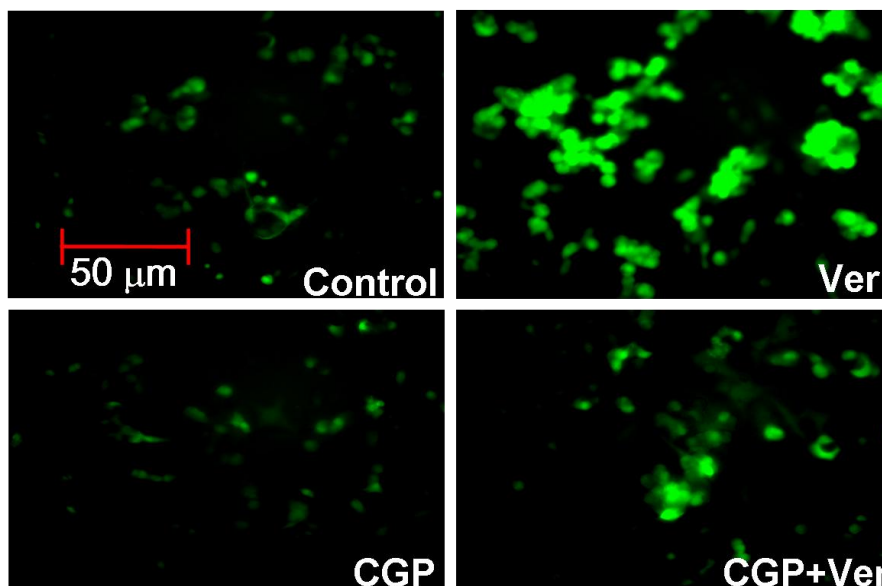
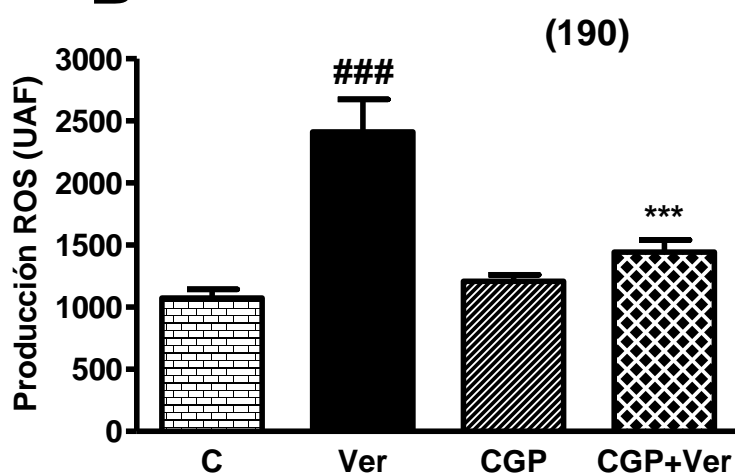
A**B**

Figura 15. Bloqueo por el CGP37157 (CGP) de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocada por veratridina (Ver). Las células se trataron con 30 μM de Ver, CGP (30 μM) o combinación de ambos durante 3 h; luego se incubaron con indicador de fluorescencia H₂DCFDA, como indican las microfotografías en el panel **A**. En el panel **B**, se muestran las medias ± S.E.M. de los valores de fluorescencia (unidades arbitrarias de fluorescencia, “AFU”); AFU se tomó como medida de producción de ROS. Los valores son de 190 células a partir de 3 cultivos diferentes. ###p<0.001, con respecto al control (C); ***p<0.001, con respecto a Ver solamente.

También se determinó la variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando la sonda fluorescente JC-1. Las células se incubaron durante 3 h con 30 μM veratridina, 30 μM CGP, o con la combinación de ambos compuestos. A continuación, las células se cargaron con JC-1 y su fluorescencia se midió como se muestra en las micrografías de la Figura 16A.

Puede verse la intensidad de fluorescencia de las células en condiciones basales, una indicación de la fuerte hiperpolarización mitocondrial (Smiley *et al.*, 1991); dicha intensidad se ha perdido en las células tratadas con veratridina, lo que sugiere que las mitocondrias están despolarizadas. Por sí solo, el CGP no afecta $\Delta\Psi_m$ pero fue capaz de prevenir la pérdida de fluorescencia provocada por veratridina. Esto se ilustra en forma cuantitativa en el diagrama de barras de la Figura 16B; la veratridina causa una marcada despolarización mitocondrial y el CGP previene dicha acción.

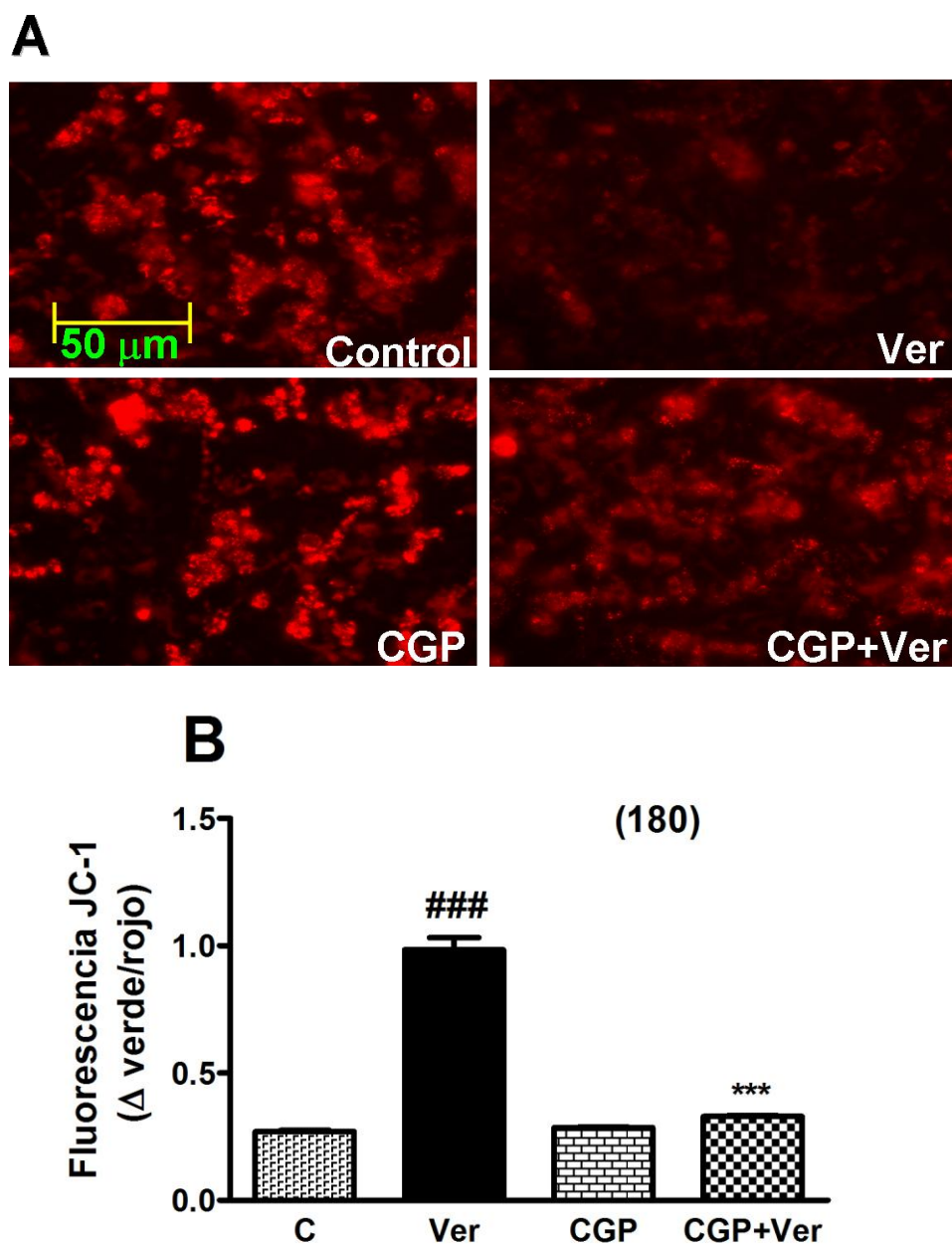


Figura 16. Bloqueo por CGP37157 (CGP) de la despolarización mitocondrial provocada por veratridina (Ver). Las células se incubaron durante 3 h con el vehículo (basal), 30 μ M Ver, 30 μ M CGP, o combinación CGP+Ver. A continuación, las células se incubaron con la sonda fluorescente JC-1, que se

acumula en la mitocondria en función de su potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). **A**, ejemplo de microfotografías de células sometidas a los tratamientos indicados; **B**, conjunto de los datos cuantitativos de 180 células a partir de 3 cultivos diferentes (medias \pm S.E.M.). ### $p < 0.001$, con respecto al control (C; *** $p < 0.001$, con respecto solo a Ver.

Un último parámetro medido fue la liberación del citocromo c al citosol, otro indicador de la interrupción de la función mitocondrial. Las células se incubaron con 30 μ M de veratridina durante 3, 6, u 8 horas a 37°C; el citocromo c citosólico aumentó cerca de 8 veces por encima de la basal, después de un período de incubación de 3 h (Figura 17A). Después de 6 y 8 h de incubación, el contenido del citocromo c se fue perdiendo en gran medida, lo que se debe probablemente a la ruptura de la membrana celular y la liberación del contenido citosólico al medio después de un largo período de incubación (Maroto *et al.*, 1994). Por lo tanto, se seleccionó el período de 3 h de incubación con veratridina para comprobar si el CGP podría mitigar el aumento de la liberación del citocromo c. La Figura 17B muestra que este fue el caso. Las células incubadas con veratridina durante 3 h muestran un aumento de 6 veces en la liberación del citocromo c con respecto a la basal; ese aumento se redujo un 30% cuando las células se incubaron conjuntamente con 30 μ M de CGP (adicionado 30 minutos antes de veratridina).

En resumen, el CGP mitiga la sobreproducción de ROS, la despolarización mitocondrial y la liberación del citocromo c en las células tratadas con veratridina. Estos efectos sugieren que el CGP se comporta como un agente protector mitocondrial.

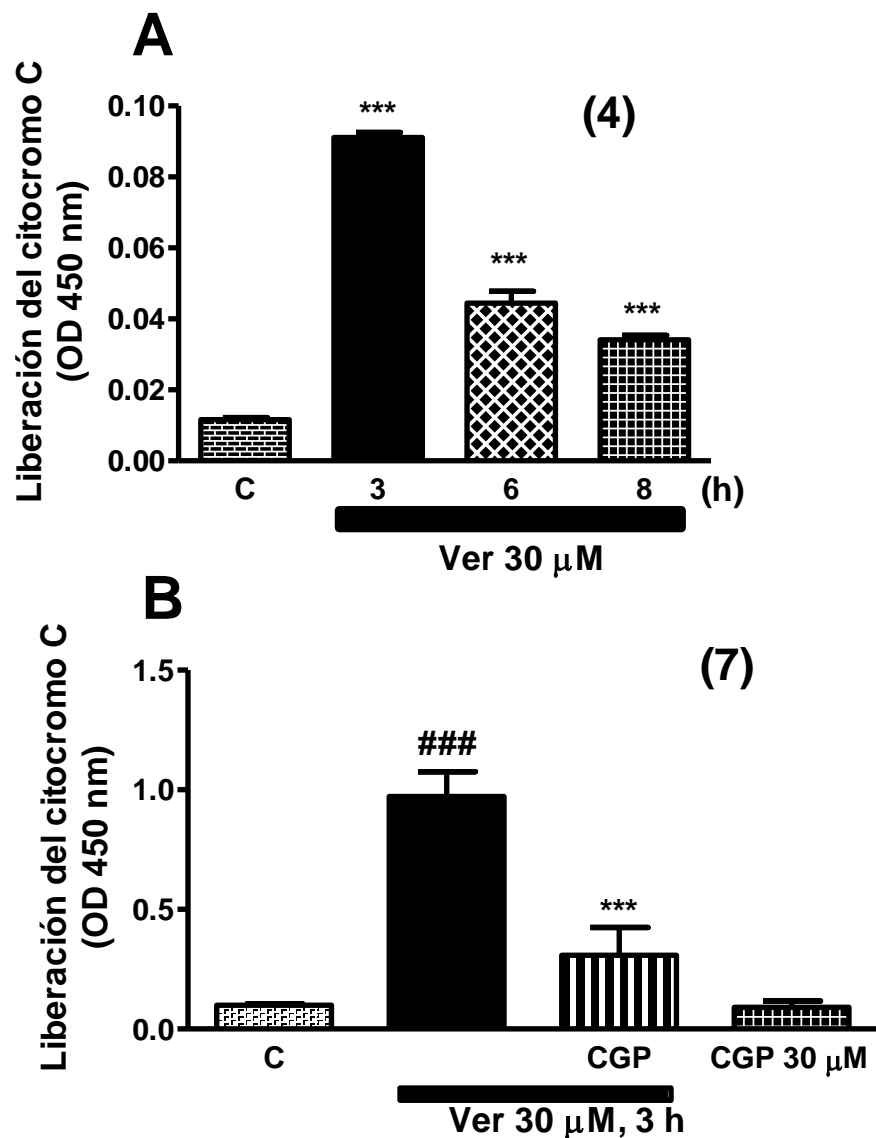


Figura 17. Efecto de CGP37157 (CGP) sobre la liberación del citocromo c mitocondrial al citosol causada por veratridina. **A**, las células se incubaron con 30 μ M de veratridina (Ver) en los periodos de tiempo indicados en el eje de abscisas. **B**, las células se incubaron con el vehículo (control), 30 μ M Ver solamente, con Ver más 30 μ M CGP (CGP se añadió 30 minutos antes de Ver), o con CGP solo, durante 3 h. Los datos son medias \pm S.E.M del número de experimentos que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en células de diferentes cultivos. **A**, *** p <0.001, con respecto a la basal. **B**, ### p <0.001, con respecto al control; *** p <0.001, con respecto solo a Ver.

(1.5) Efectos de CGP sobre las corrientes de sodio (I_{Na}) y las corrientes de calcio (I_{Ca})

Los experimentos anteriores sugieren que el CGP podría estar protegiendo la mitocondria frente a la lesión inducida por la veratridina. Se planteó la cuestión

si tales acciones citoprotectoras están vinculadas a ambos, un efecto sobre el mNCX como una interferencia en los canales Na^+ y Ca^{2+} . Por lo tanto, hemos realizado experimentos de patch-clamp en fijación de voltaje a fin de determinar si el CGP estaba afectando I_{Na} y/o I_{Ca} .

A 30 μM , el CGP causó una inhibición progresiva de la I_{Na} , tomando cerca de 2-3 minutos para bloquear aproximadamente el 50% de la corriente (Figura 18A). La I_{Na} se recuperó inmediatamente después de lavar el CGP (80% de recuperación en cerca de 20 s). La perfusión de las células con 1 μM de tetrodotoxina (TTX) produjo un bloqueo completo de I_{Na} ; al lavar la toxina, la corriente se recuperó de forma gradual y completa. La Figura 18B muestra el trazado original de I_{Na} obtenido durante los pulsos despolarizantes indicados por las letras pequeñas en la Figura 18A. La I_{Na} exhibe muy rápida activación e inactivación, alcanzando niveles basales en aproximadamente 2.5 ms. La Figura 18C muestra la curva promedio corriente-voltaje; el umbral de activación fue de alrededor de -45 mV; el pico de I_{Na} se alcanzó a -10 mV, y la aparente inversión de potencial aconteció a +50 mV. A 30 μM , el CGP redujo el pico de I_{Na} en un 60%; no hubo cambio en la curva I/V . La Figura 18D muestra la curva concentración-respuesta en la que se obtuvo una CI_{50} de 22 μM para la inhibición de I_{Na} por el CGP.

En otra serie de experimentos se estudiaron los efectos de CGP sobre I_{Ca} . La Figura 19A muestra el curso temporal de I_{Ca} (medido como el área de la carga, Q_{Ca} , una vez que fue suprimida la I_{Na}) en fijación de voltaje a -80 mV y estimulando las células con pulsos controles despolarizantes dados a intervalos de 10 s. En aproximadamente un minuto, 30 μM CGP redujo la I_{Ca} cerca de un 45%. El cadmio (Cd^{2+} , 100 μM) inhibió completamente I_{Ca} de manera reversible. La Figura 19B muestra los registros de corrientes originales de una célula. Obsérvese el pico de corriente inicial I_{Na} con su típica inactivación rápida, y las corrientes I_{Ca} que sufrieron una lenta inactivación. Los trazados de I_{Ca} obtenidos con CGP se registraron después de 1 min de perfusión de las células con 30 μM del compuesto; el CGP no varía la corriente de inactivación.

A 10 μM , el CGP causó una pequeña y gradual caída de I_{Ca} (alrededor del 20%) que también se recuperó gradual y lentamente al lavar el compuesto (Figura 19C). En la Figura 19D se muestran ejemplos de trazados obtenidos antes y después de 1 min de perfusión de CGP. Los resultados promedios se representan en las Figuras 19E y F; 30 μM CGP bloquea I_{Ca} un 60% mientras que 10 μM bloquea un 18%.

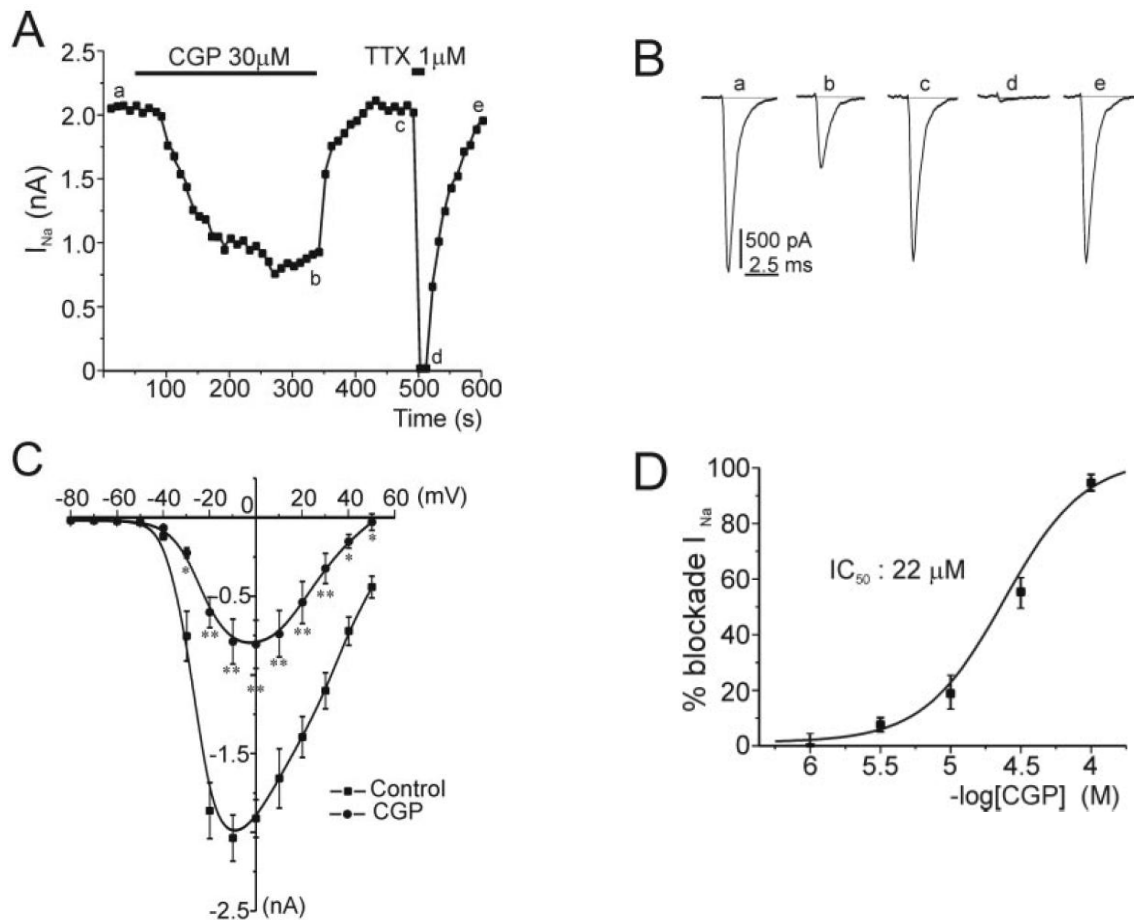


Figura 18. Bloqueo por CGP37157 (CGP) de las corrientes de sodio (I_{Na}), medidas con la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera. El voltaje de la célula se fijó a -80 mV. Tras la rotura del sello, se aplicaron regularmente varios pulsos despolarizantes de 10 ms a intervalos de 10 s. La I_{Na} se estabilizó después de 5-10 pulsos. **A**, curso temporal del pico I_{Na} , que se generó por la aplicación de pulsos despolarizantes a 0 mV. El CGP y la tetrodotoxina (TTX) según lo indicado en la parte superior por las barras horizontales. **B**, los trazados originales de I_{Na} se tomaron en los puntos indicados por letras minúsculas en **A**. **C**, curvas I-V construidas con el pico I_{Na} obtenido por la aplicación de pulsos despolarizantes en intervalos de 10 mV, dados en ausencia y en presencia de CGP. **D**, la curva concentración-respuesta para la inhibición de CGP de I_{Na} . Los datos en **C** y **D** son medias \pm S.E.M. La curva del panel **D** se construyó con datos de 5-12 células de diferentes cultivos.

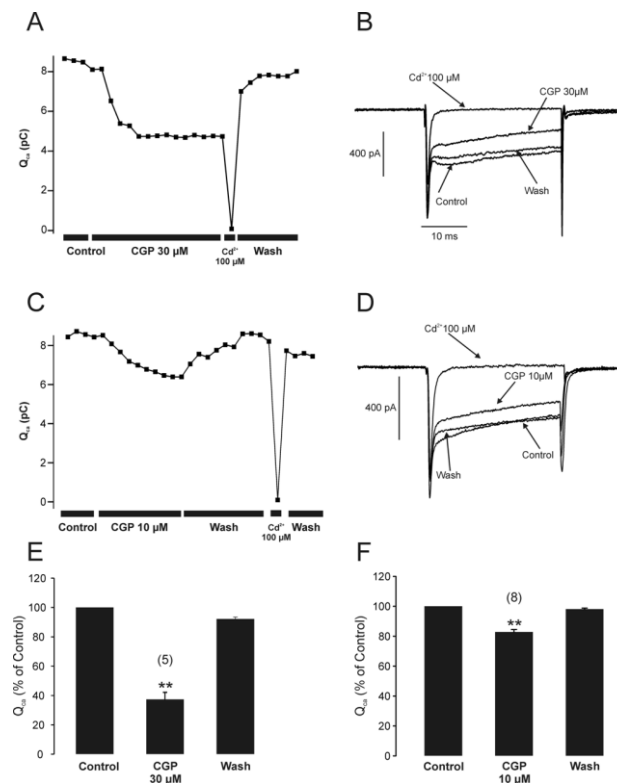


Figura 19. Bloqueo parcial por CGP37157 (CGP), de las corrientes de calcio (I_{Ca}). La I_{Ca} se registró con la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera, con 2 mM de Ca^{2+} como portador de carga. El voltaje de las células se fijó a -80 mV; I_{Ca} se generó con pulsos controles de 30 ms a 0 mV, dados a intervalos de 10 s. **A**, el curso temporal de I_{Ca} se midió como área del trazado I_{Ca} (Q_{Ca} , ordenadas), quitando el componente inicial de I_{Na} , tal como se muestra en el panel **B**. Se perfundió el CGP y el cadmio (Cd^{2+}) según se indica en las barras de la parte inferior. **B**, Los registros originales I_{Na} e I_{Ca} se tomaron de una célula, antes (control) y 1 minuto después de perfusión con CGP. **C**, un experimento ejemplo del curso temporal de Q_{Ca} , antes, durante, y después de 10 μ M CGP; **D**, ejemplo de registros tomados de **C**, después de 1 min de perfusión con 10 μ M CGP. **E**, **F**, promedio de resultados que muestra el bloqueo de Q_{Ca} por CGP en la cantidad de células indicadas en paréntesis. ** $p < 0.01$ con respecto al control.

(1.6) El CGP causa un bloqueo reversible de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_c$ inducidas por la veratridina

La veratridina causa oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ en las células cromafines bovinas. Esas oscilaciones se han asociado a efectos lesivos de la toxina para la célula, ya que son suprimidas por manipulaciones iónicas y por compuestos que causan citoprotección contra veratridina, es decir, tetrodotoxina (para bloquear los canales Na^+), flunarizina o ω -conotoxina MVIIC (para bloquear los canales Ca^{2+}), y privación de Na^+ o Ca^{2+} (Maroto *et al.*, 1994; Maroto *et al.*, 1996; Novalbos *et al.*, 1999). Puesto que el CGP protege contra la toxicidad de

veratridina, se estimó que sería interesante saber si este compuesto era capaz de suprimir las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_c$ provocadas por la toxina.

Las células se cargaron con Fluo-4AM y se perfundieron con una solución Tyrode. En estas condiciones, no se observaron oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_c$ durante un periodo de registro de 30 minutos. Para probar los efectos de veratridina sobre la $[Ca^{2+}]_c$, las células representadas en la Figuras 20A,B se perfundieron inicialmente con Tyrode y una vez alcanzada la línea basal estable, se perfundió veratridina (30 μ M). Las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ se produjeron tras una demora de 1 minuto. La adición de 5 μ M de CGP no afectó el patrón de dichas oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ (Figura 20B). La medición del número de oscilaciones durante un período de 5 minutos revela que 5 μ M CGP carece de efecto (Figura 20D). En cambio, 30 μ M CGP suprime las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_c$ que rápidamente se recuperaron al lavar el compuesto, tal como se muestra en el ejemplo de células de la Figura 20A. En 33 células, 30 μ M CGP inhibe un 63% las oscilaciones producidas por la veratridina (Figura 20C).

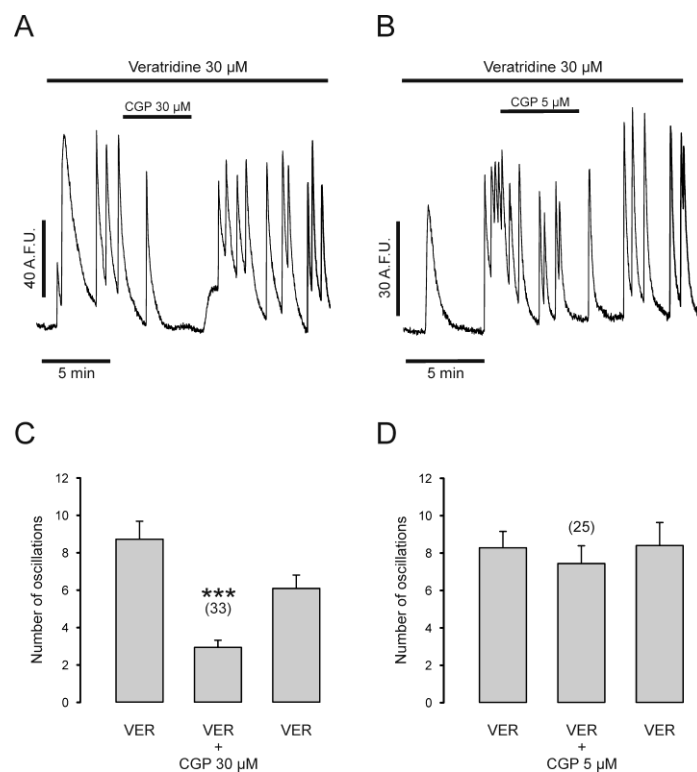


Figura 20. CGP37157 (CGP) causa un bloqueo reversible de las oscilaciones del calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) evocadas por veratridina (Ver). **A, C**, las células cargadas con Fluo-4 AM. Se perfundió inicialmente con solución Tyrode. Una vez que la fluorescencia de la línea de base se estabilizó, la Ver se aplicó de forma continua y focalmente con una pipeta a la célula, como se indica en la parte superior a lo largo de las

barras horizontales en los paneles A y B. El CGP se perfundió junto con Ver durante el período de tiempo indicado en la parte superior por la barra corta horizontal. **C, D**, resultados conjuntos del número de células indicadas en paréntesis. El número de oscilaciones inducidas por Ver fue contado durante 5 minutos antes, en presencia y después de la aplicación de la CGP (ordenada). Los datos son medias \pm S.E.M **p<0.01, ***p<0.001, comparado a Ver.

(2) Experimentos realizados con CGP37157 en rodajas de hipocampo para explorar la hipótesis del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial como diana para la neuroprotección farmacológica (artículo N° 2)

(2.1) Efecto neurotóxico de veratridina en rodajas de hipocampo de rata

Hace mucho tiempo se demostró que la veratridina ejerce efectos neurotóxicos en cultivo de neuronas cerebrales de rata (Pauwels *et al.*, 1989), en el hipocampo de rata (Ashton *et al.*, 1990), así como en células cromafines de la médula adrenal bovina (Maroto *et al.*, 1994). El primer experimento de este estudio fue planeado, por tanto, para comprobar si en nuestras manos, la veratridina causaría también la muerte neuronal en los tejidos cerebrales intactos y, más concretamente, en rodajas de hipocampo de rata, tal como se demostró por Ashton *et al.* (1990). Para explorar esta pregunta se utilizó el protocolo de la Figura. 21A, que consiste en dos períodos de estabilización del tejido en soluciones oxigenadas de Krebs-bicarbonato, seguido de un período de 4 h de exposición del tejido a concentraciones crecientes de veratridina.

La Figura. 21B muestra la relación entre la reducción de MTT causada por las mitocondrias de las neuronas viables, frente a la concentración de veratridina. Evidentemente, la capacidad máxima de reducción de MTT fue la de las neuronas controles cuyos tejidos se encuentran en buen estado. Es interesante observar que a 1 y 3 μM , la veratridina causa una disminución significativa de un 15,7% y 24% respectivamente de la reducción de MTT; a estas concentraciones, la veratridina no aumentó la muerte de las células cromafines por encima de las condiciones basales (Maroto *et al.*, 1994; Nicolau *et al.*, 2009). Parece que la reducción de MTT podría ser un marcador más sensible de la viabilidad celular (y muerte celular), en comparación con la LDH que se libera en el medio sólo cuando la membrana celular pierde integridad y la célula

está muerta (Maroto *et al.*, 1994; Egea *et al.*, 2007b). En cualquier caso, hubo un efecto dependiente de la concentración de veratridina causando una reducción gradual de la reducción de MTT que alcanzó el 46,1% a 100 μ M.

La Figura. 21C muestra la muerte neuronal en función de la concentración de veratridina. La concentración umbral fue de 1 μ M y el efecto fue casi máximo a las concentraciones 30-100 μ M. La $CE_{50} \approx 2 \mu$ M se calculó usando el gráfico sigmoideo. Para los experimentos siguientes se utilizaron 30 μ M de veratridina y un período de incubación de 3.5 h.

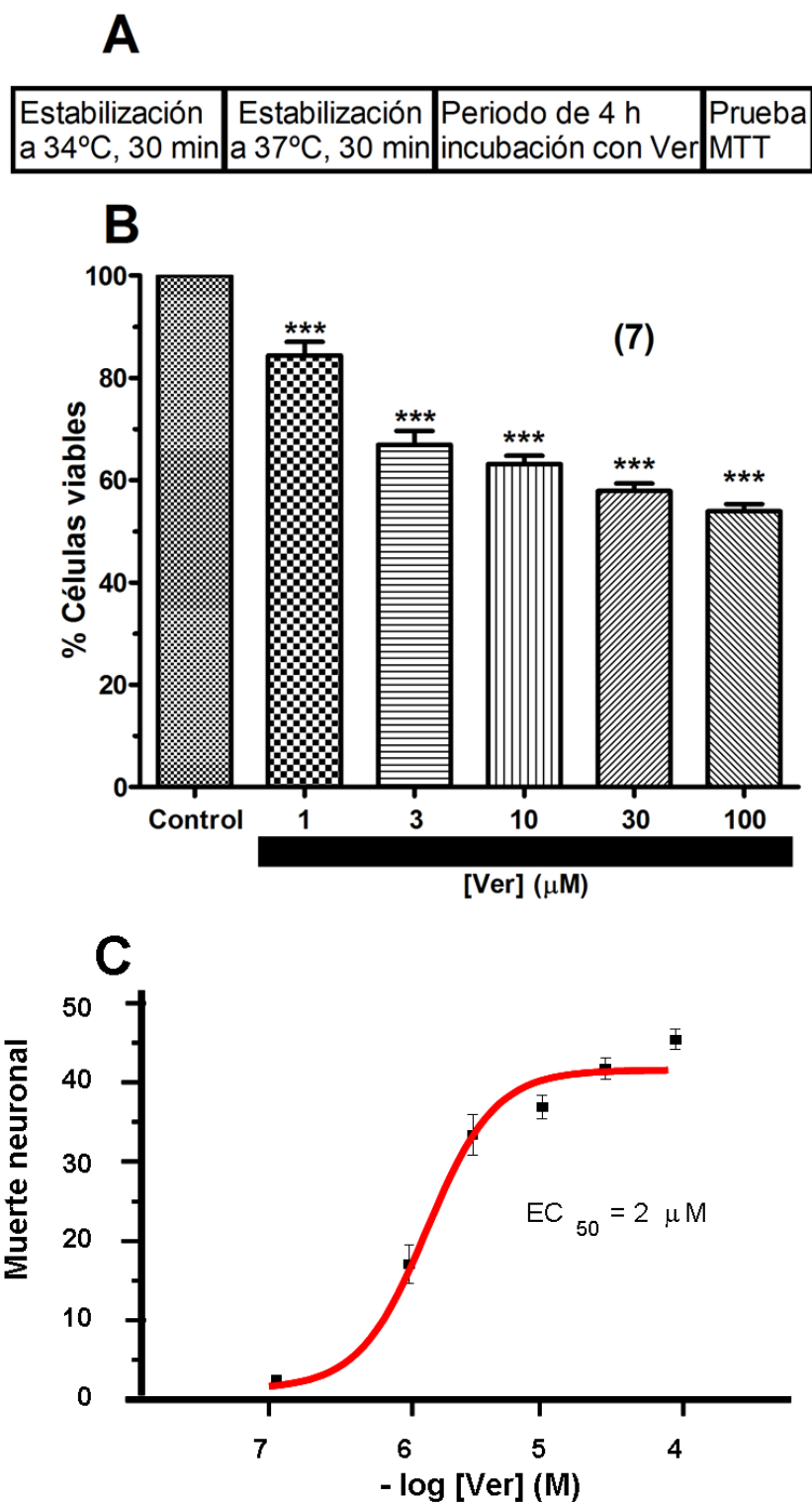


Figura 21 Efectos de la veratridina (Ver) sobre las rodajas de hipocampo de rata Sprague Dawley. **A**, protocolo utilizado en este experimento; **B**, pérdida de viabilidad neuronal en función de la concentración de Ver; **C**, curva concentración-efecto de la muerte neuronal producida por la Ver, calculada en función de la pérdida de viabilidad neuronal. Los datos son medias \pm EE. de la cantidad de experimentos que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en diferentes rodajas de ratas en diferentes días. *** $p < 0.001$, con respecto al control.

(2.2) El CGP protege las rodajas de hipocampo de rata frente a la neurotoxicidad inducida por veratridina

Recientemente hemos publicado que el CGP, un bloqueador del mNCX, protege las células cromafines bovinas contra la muerte inducida por veratridina (Nicolau *et al.*, 2009). Por lo tanto, tratamos de demostrar aquí si ese efecto se observa también en el tejido cerebral intacto, es decir, en rodajas de hipocampo de rata. La Figura. 22A muestra el protocolo utilizado para explorar los efectos de CGP frente a la neurotoxicidad provocada por veratridina. Las rodajas se preincubaron durante 30 min con concentraciones crecientes de CGP; posteriormente, se coincubaron con veratridina 30 μ M por un período de 3.5 horas.

La Figura. 22B muestra que en ausencia de CGP, la veratridina causó una pérdida del 39% de la capacidad del tejido para reducir la MTT. A 1 μ M, el CGP no aumentó la reducción de MTT; el umbral de concentración efectiva fue de 3 μ M. La viabilidad neuronal aumentó con 10 y 30 μ M. A 100 μ M, no se observó un incremento adicional de reducción de MTT, lo que puede deberse al hecho de que a elevadas concentraciones (pero no a las concentraciones bajas), el CGP posee un efecto citotóxico directo (Nicolau *et al.*, 2009).

Cuando los datos de reducción del MTT se expresaron en términos de porcentaje relativo de neuroprotección, se encontró un efecto dependiente de la concentración en el rango de 3-30 μ M. Se determinó la CE_{50} que es aproximadamente de 5 μ M, (Figura 22C). La máxima neuroprotección ofrecida por el CGP fue del 51%. Este efecto máximo podría deberse a un efecto neurotóxico directo a la concentración más alta del compuesto, como se mencionó anteriormente.

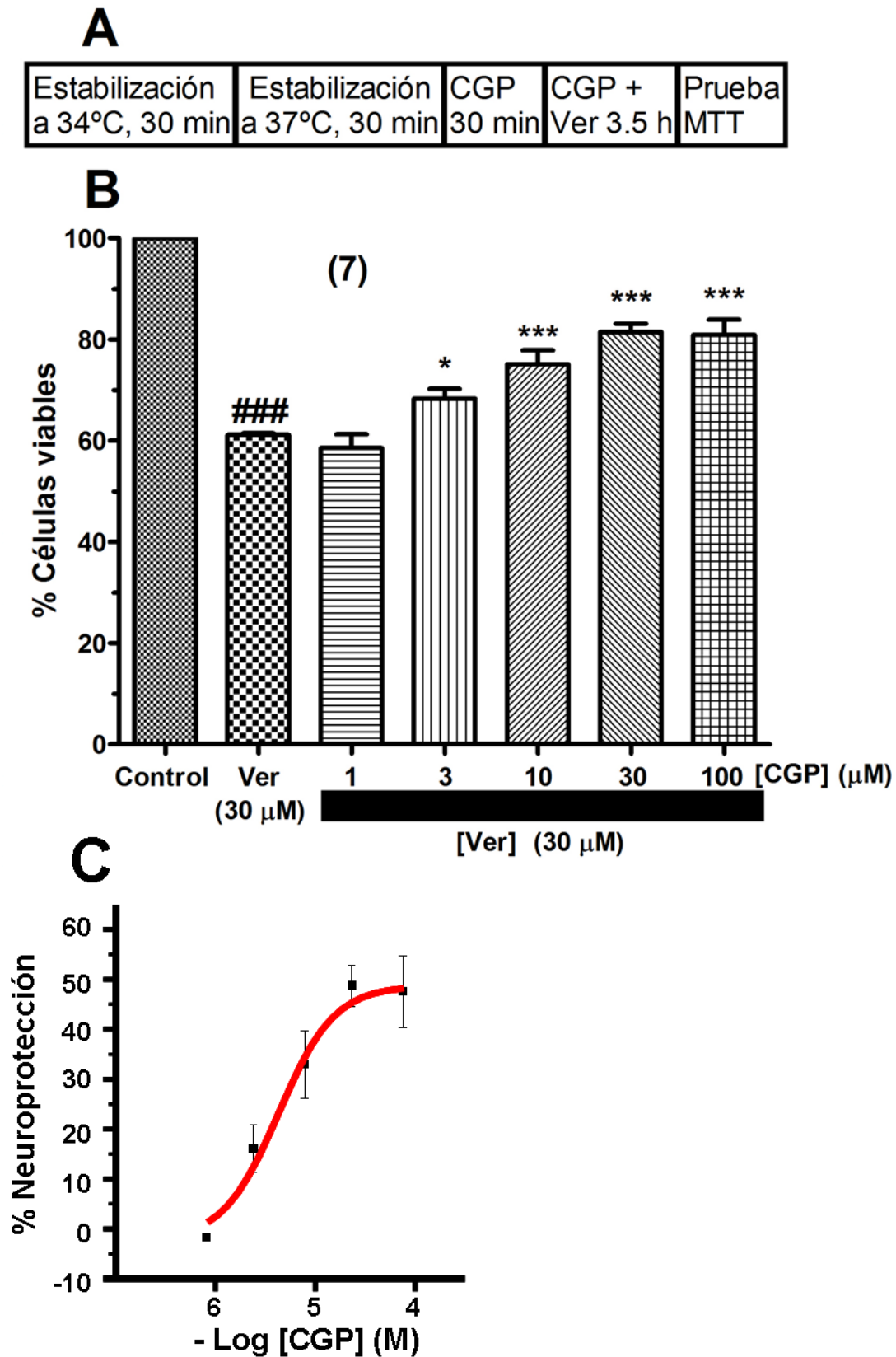


Figura 22 El CGP37157 (CGP) protege las rodajas de hipocampo de rata contra los efectos neurotóxicos de veratridina (Ver). **A**, protocolo experimental que consiste en dos periodos de estabilización de 30 min a 34°C y 37°C, seguido de un periodo de preincubación de 30 min con CGP en las concentraciones indicadas en la abscisas, y un periodo de coincubación de 3.5 h con CGP y Ver. **B**, la reducción de MTT

en las rodajas sometidas a diferentes concentraciones de CGP, como indicador de la supervivencia neuronal, expresada en la ordenada como % del control. **C**, transformación de los datos de reducción de MTT en protección neuronal normalizando al 100% los daños causados por la Ver en ausencia de CGP (es decir 40% de inhibición de la reducción de MTT) como ventana de la neuroprotección ofrecida por CGP. Se calculó la $EC_{50} \approx 5 \mu M$ que induce neuroprotección mediante una sigmoide. Los datos son medias \pm E.E. por cuadruplicado de 7 experimentos realizados en 7 ratas diferentes. ### $P < 0,05$ con respecto al control; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ con respecto al daño neuronal producido por Ver.

(2.3) Efectos de los bloqueantes de los canales de calcio sobre la acción neurotóxica de veratridina

Durante más de dos décadas, el CGP ha adquirido reputación como un bloqueador del mNCX. Sin embargo, su selectividad para esta acción ha sido cuestionada sobre la base de su capacidad para bloquear los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) cardíacos de subtipo L (Thu le *et al.*, 2006), así como los CCDV de subtipos N/PQ de las células cromafines (Nicolau *et al.*, 2009). Por lo tanto, fue de suma importancia comparar los efectos neuroprotectores de CGP con la de los bloqueadores de los CCDV. Las concentraciones bien conocidas de los bloqueantes para inhibir completamente los subtipos de CCDV son las siguientes: subtipo L, $3 \mu M$ de nimodipino; canales N, $1 \mu M$ GVIA; canales PQ, $1 \mu M$ IVA; o la combinación N y PQ; $1 \mu M$ MVIIC. Estos bloqueantes y concentraciones se utilizaron siguiendo el protocolo que se muestra en la Figura 23A.

La figura 23B muestra claramente que la veratridina provocó una reducción de MTT del 37,2%. Ni nimodipino, GVIA, IVA, o MVIIC produjeron una disminución significativa de la reducción del MTT en los tejidos expuestos a veratridina. Incluso un tratamiento combinando a base de nimodipino, GVIA y IVA no pudo atenuar la neurotoxicidad producida por veratridina. En contraste, $1 \mu M$ de TTX, un bloqueador de los canales de sodio bloqueó, casi por completo los efectos neurotóxicos de veratridina.

Aunque se utilizaron concentraciones supramáximas de los bloqueantes de los CCDV, la posibilidad de que la toxina no pudiera llegar a todos los compartimentos de tejido neuronal podría explicar su falta de actividad. Por lo tanto, se realizaron experimentos con concentraciones mayores, es decir, $2 \mu M$ de cada toxina: GVIA, IVA, o MVIIC. Por otra parte, también se estudiaron los

efectos de una mezcla conteniendo esas elevadas concentraciones de toxinas más 30 μ M de nimodipino. La Figura. 23C muestra los resultados de este experimento. La veratridina causó una disminución de 38.2% de reducción de MTT. En presencia de IVA dicha disminución se redujo significativamente al 37.2%. Al parecer la GVIA y el MVIIC también presentan alguna disminución de la lesión de veratridina; sin embargo, estos efectos no fueron estadísticamente significativos. La combinación de toxinas más la alta concentración de nimodipino también mitigó los daños de veratridina a 50.3% de manera estadísticamente significativa.

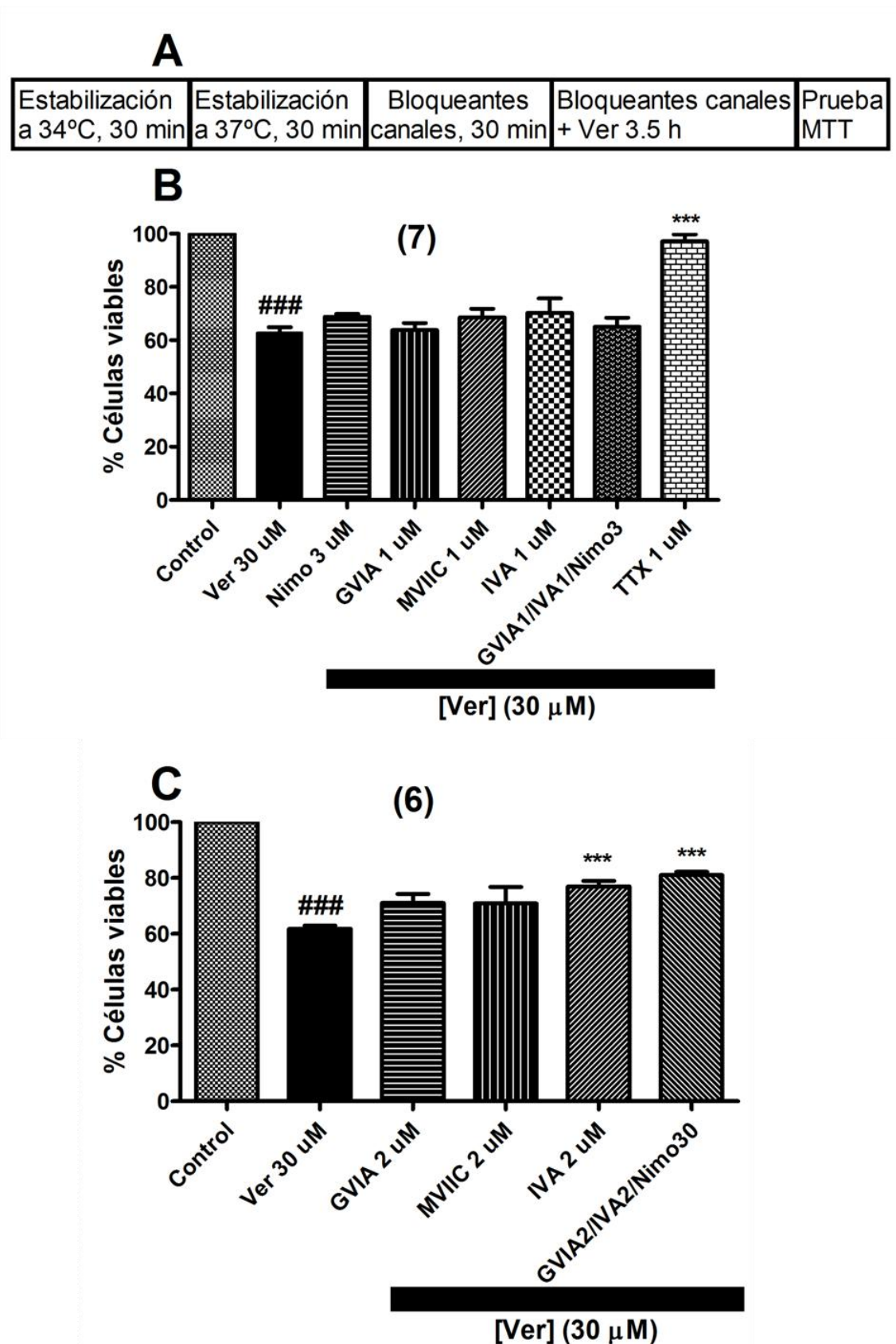


Figura 23. Efectos de los bloqueantes de los canales iónicos sobre las lesiones neuronales inducidas por veratridina (Ver). **A**, protocolo experimental que consiste en dos periodos consecutivos de incubación de las rodajas de hipocampo en soluciones de Krebs-bicarbonato que se burbujearon continuamente con carbógeno estabilizando de este modo el tejido siguió un tercer periodo de 30 min de preincubación con los bloqueantes de los CCDV: canales L, (nimodipino); canales N, ω -conotoxina GVIA (GVIA); canales

P/Q, ω -agatoxina IVA (IVA); la mezcla de los tres bloqueantes o tetrodotoxina (TTX), en las concentraciones indicadas en la abscisas del panel **B**; para el cuarto período (coincubación), la solución en la que están sumergidas las rodajas se cambió por otra fresca que contiene los bloqueantes de los CCDV en las mismas concentraciones que se indican más 30 μ M Ver durante 3.5 h. Las rodajas controles no contienen ni bloqueantes ni Ver; un grupo adicional de rodajas se trataron solo con Ver como referencia a la lesión neuronal en cada experimento individual. **B**, la capacidad de reducción de MTT (ordenada) de las rodajas sometidas a los diferentes tratamientos, expresados como % del control. **C**, este experimento se hizo siguiendo el mismo protocolo, pero con mayores concentraciones de los bloqueantes, como se indica en la abscisas. Los datos son medias \pm EE en cuadruplicado de la cantidad de experimentos realizados en diferentes animales que se indican en paréntesis. ### $p < 0.001$ en comparación con el control; *** $p < 0.001$ en comparación con Ver.

(2.4) El CGP mitiga el exceso de producción de las especies reactivas del oxígeno en rodajas expuestas a veratridina

La sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} conduce a la excesiva producción de ROS, que podría ser la señal para iniciar el proceso de muerte neuronal y neurodegeneración (Dyken, 1994). Por lo tanto, es plausible que la veratridina podría aumentar la producción de ROS en rodajas de hipocampo lo que podría ser mitigado por el CGP, como se demostró en el caso de las células cromafines tratadas con veratridina (Nicolau *et al.*, 2009). Para probar esta posibilidad, las rodajas se sometieron a un protocolo similar al utilizado para el estudio de neurotoxicidad provocada por veratridina. Dicho protocolo se muestra en Figura 24A. Al final del periodo de 3.5 h de incubación con 30 μ M de veratridina, las rodajas de hipocampo contienen 2.5 veces más concentración de ROS, en comparación con el tejido control. 1 μ M TTX (utilizado como control positivo) redujo en un 73% la producción de ROS provocada por la toxina. La inhibición de la producción de ROS por CGP en el tejido tratado con veratridina fue del 77.1% (Figura 24B).

A

Estabilización a 34°C, 30 min	Estabilización a 37°C, 30 min	TTX o CGP, 30 min	TTX o CGP + Ver 30 μ M 3.5 h	Medición del ROS producido
----------------------------------	----------------------------------	-------------------------	----------------------------------------	----------------------------------

B

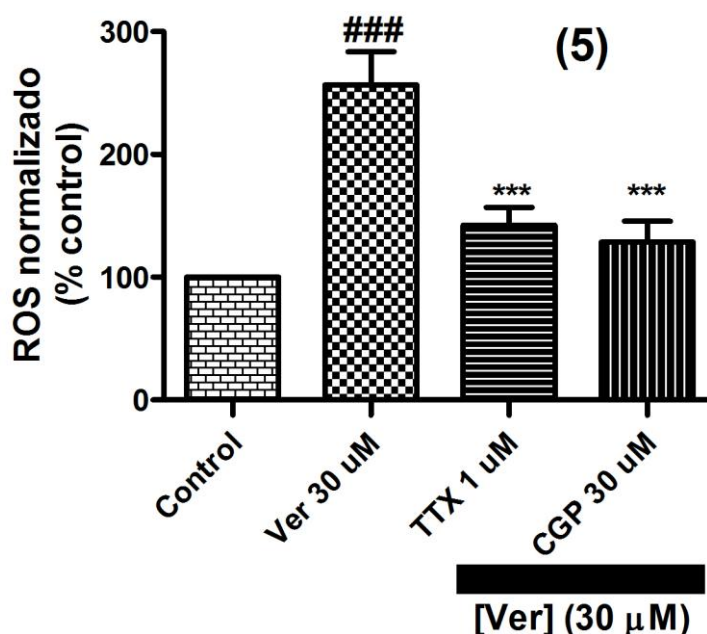


Figura 24 Inhibición por el CGP37157 (CGP) de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por veratridina (Ver) en rodajas de hipocampo de rata. **A**, protocolo experimental consistente en cuatro periodos de incubación secuenciales de las rodajas en soluciones de Krebs-bicarbonato continuamente burbujeadas con carbógeno. Tras la estabilización con dos periodos de 30 min a 34°C y 37°C, las rodajas se preincubaron con TTX o CGP durante 30 min a las concentraciones indicadas y, posteriormente se siguió de coincubación con las mismas concentraciones de TTX o CGP más 30 μ M Ver durante un periodo de 3,5 h. Las rodajas controles se incubaron en soluciones que no contenían fármacos. **B**, la producción de ROS por las rodajas al final de cada tratamiento, se midió con la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA como (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia-UAF- ordenada). Las rodajas controles en la producción de ROS se incubaron durante 3,5 h en ausencia de fármacos, se expresó en UAF se normalizó al 100%; los valores de las rodajas tratadas con los compuestos se expresan como % del control. Los datos son medias \pm EE de cinco experimentos por cuadruplicado realizados con 5 animales diferentes. ###p<0.001 con respecto al control; ***p<0,001 con respecto a Ver.

(2.5) Implicación de la p38 MAPK en los efectos neurotóxicos de veratridina y neuroprotectores de CGP37157

A fin de investigar la ruta de la muerte intracelular implicada en la neurotoxicidad de veratridina y de los efectos neuroprotectores del CGP se midió la activación de la p38 MAPK, relacionada con la muerte celular y la

inflamación (Xia *et al.*, 1995; Hetman *et al.*, 1999). De hecho, la inhibición de p38 MAPK se ha relacionado con potenciales efectos neuroprotectores en diferentes enfermedades humanas (Barone *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2001). Como se muestra en la Figura 25, la veratridina provocó un aumento de 3 veces la activación de la p38 en comparación con las rodajas controles. El CGP redujo significativamente la fosforilación de la p38 en un 65% mientras que la obtenida con el TTX es de 69%.

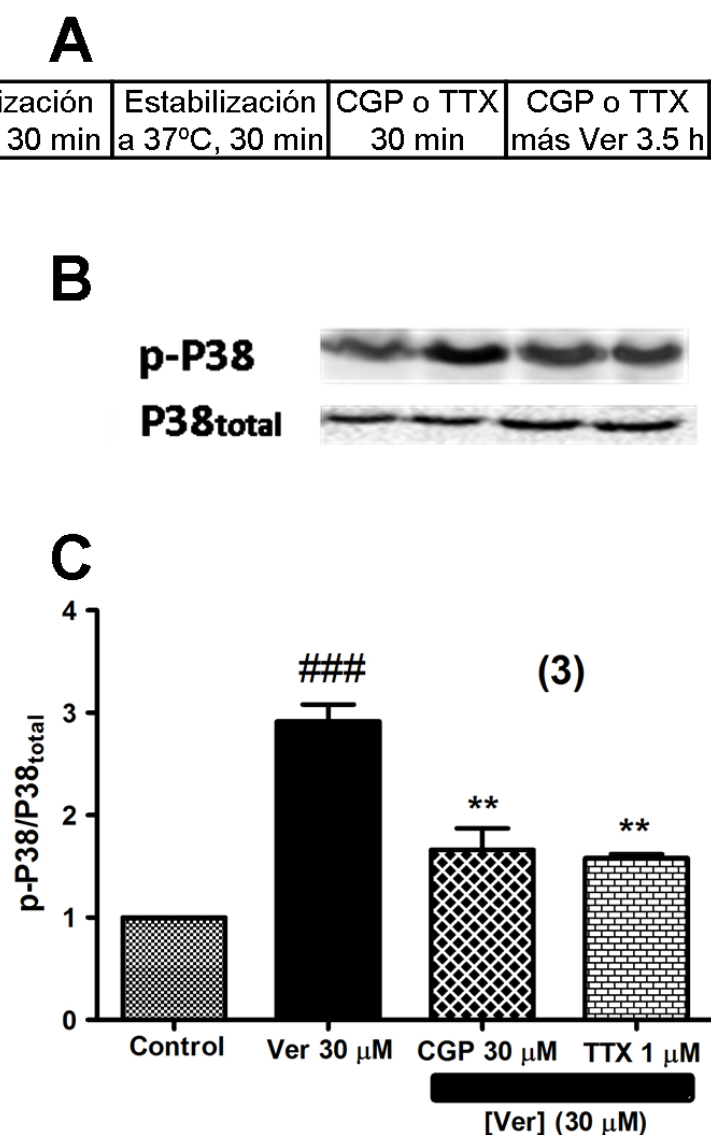


Figura 25 Determinación de la p38 mediante Western blot. **A**, protocolo usado tal como se explicó en materiales y métodos. **B**, el blot mostrando la fosforilación de la p38 por parte de veratridina (Ver) y cómo el CGP impide la fosforilación de la misma en rodajas de hipocampo de rata. **C**, el análisis de Western blot para p38 obtenida a partir de las proteínas extraídas de las rodajas de hipocampo de rata mantenidas en solución control o sometidas a veratridina durante 3.5 h en ausencia o presencia de 30 μ M de CGP o 1

μM de TTX. Los datos son media \pm EE de proteínas 3 experimentos realizados con 3 animales diferentes. ### $p < 0.001$ con respecto al control y ** $p < 0.01$ con respecto a veratridina.

(3) Estudios sobre la interacción del CGP37157 con los bloqueantes de canales de calcio, en células cromafines incubadas con la veratridina

Conocida la lesión de la veratridina en las células cromafines bovinas (Figura 11B), se planificaron experimentos cuyos resultados se reflejan en la Figura 26, donde las células se expusieron a concentraciones crecientes tanto de veratridina, CGP como de los diferentes bloqueantes de los canales de calcio en DMEM libre de suero e incubadas a 37°C durante 24 h. La Figura 26A muestra la LDH de la curva control, o sea veratridina, y tres curvas de tres concentraciones de CGP. La muerte por veratridina aumenta considerablemente de 8% para veratridina $1 \mu\text{M}$ a 42% para la máxima concentración de veratridina usada al cabo de 24 h de incubación. O sea, se reproducen los mismos resultados de la Figura 11B. Mientras que en las mismas condiciones, cuando las células se preincubaron 30 min con las tres concentraciones indicadas de CGP, seguido de su co-incubación con el tóxico en cuestión, se observa una pronunciada citoprotección dependiente de la concentración del CGP, como la obtenida en la Figura 12B. Las células en la Figura 26B se expusieron a las mismas condiciones que en el panel A, pero en el lugar de CGP se usaron diferentes bloqueantes de los canales de calcio. Las células se preincubaron con dichos bloqueantes así como la combinación de nimodipino $2 \mu\text{M}$, ω -conotoxina GVIA (GVIA) $1 \mu\text{M}$ y ω -agatoxina IVA (IVA) $1 \mu\text{M}$; y posteriormente se coincubaron con la veratridina. Como se observa, ni el nimodipino ni la GVIA pudieron proteger frente a la citotoxicidad veratridínica. Sólo la mezcla de los tres bloqueantes produjo una drástica citoprotección, similar a la que produjo el CGP $30 \mu\text{M}$.

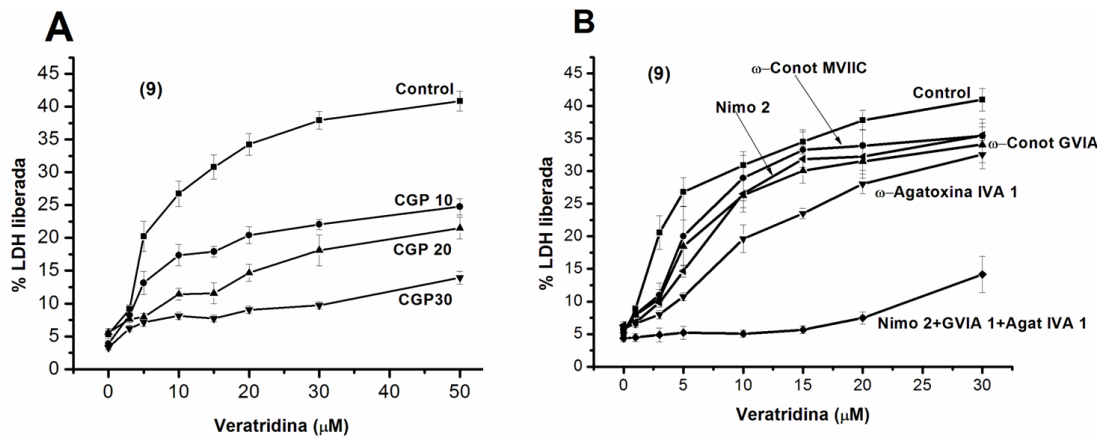


Figura 26 Efecto comparativo de la citoprotección proporcionada por el CGP y por los diferentes bloqueantes de los canales de Ca^{2+} de los subtipos L (nimodipino 2 μM -Nimo-), N (ω -conotoxina GVIA 1 μM -GVIA-), N y P/Q (ω -conotoxina MVIIC 1 μM -MVIIC-) y P/Q (ω -agatoxina IVA 1 μM -IVA-), frente a la citotoxicidad inducida por concentraciones crecientes de veratridina (abscisas). **A**, las células cromafines bovinas en placas individuales se pre-incubaron con 10, 20 y 30 μM de CGP durante 30 min, a continuación se adicionó a cada placa concentraciones crecientes de veratridina hasta las 24 h. **B**, las células se pre-incubaron durante 30 min con Nimo, GVIA, MVIIC, IVA 1 μM o la mezcla de Nimo/GVIA/IVA, luego se adicionó veratridina en concentraciones crecientes como se indica en la abscisas durante 23.5 h. La curva control en cada panel corresponde a la curva concentración dependencia de veratridina. Los datos son medias \pm S.E.M del número de experimentos que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en células de diferentes cultivos.

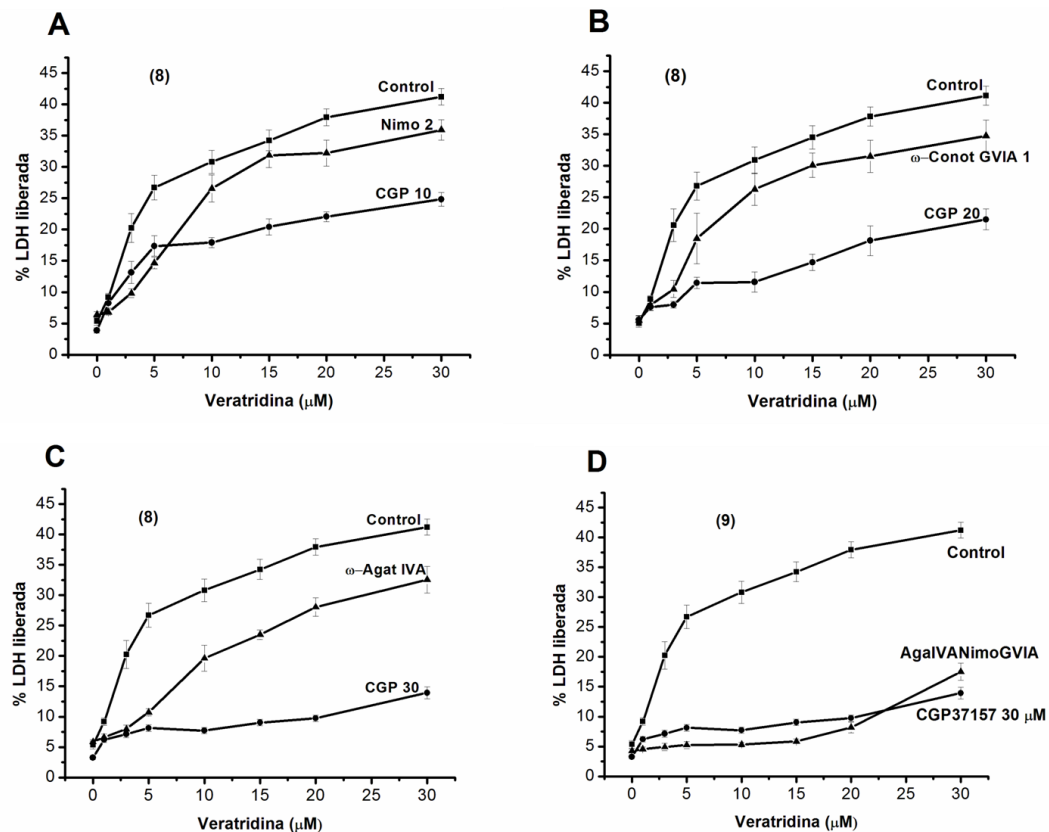


Figura 27 Efectos citoprotectores de diferentes concentraciones de CGP37157 (CGP) a igualdad de bloqueo de los canales de calcio comparado con las distintas toxinas. **A**, Las células se pre-incubaron con nimodipino 2 μM (Nimo) o CGP 10 μM (CGP10) que ambos bloquean a esas concentraciones un 20% de los canales de calcio de subtipo L; **B**, ω -Conotoxina GVIA 1 μM (GVIA) o CGP 20 μM (CGP20) que

bloquean por igual un 30% de los canales de calcio de subtipo N; **C**, ω -Agatoxina IVA 1 μ M (IVA), CGP 30 μ M (CGP30) que bloquean aproximadamente un 50% de los canales de calcio de subtipo PQ; **D**, la mezcla de Nimo/GVIA/IVA que bloquean la totalidad de los canales de calcio o el CGP30 que tan solo bloquea aproximadamente un 45% de los canales de calcio. la pre-incubación duró 30 min, después de ese tiempo se adicionó veratridina en concentraciones crecientes hasta las 24 h. La curva control en cada panel corresponde a la curva concentración dependencia de veratridina. Los datos son medias \pm S.E.M del número de experimentos que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en células de diferentes cultivos.

En base a los resultados obtenidos en la Figura 13, en los que las células se pre-trataron con el CGP durante 30 min seguido de solo lavado, solo veratridina o co-incubación con veratridina hasta las 24 h, surgió la pregunta de si el CGP podría rescatar las células expuestas a pulsos de 1 h de veratridina. Usando los mismos protocolos aplicados para la Figura 13, las células se trataron con veratridina 30 μ M a diferentes tiempos desde 1 min hasta 1 h; pasado esos tiempos las células se expusieron a 30 μ M de CGP o solo al lavado con DMEM hasta las 24 h. En la Figura 28A, se aprecia que las células expuestas a veratridina hasta los 30 min, seguido de la adición del CGP, no presentan diferencias con respecto al control. Mientras que a los 60 min de exposición de las células a veratridina ya se empiezan a activar los diferentes eventos apoptóticos que conducen a la muerte celular (Figura 28A). En la Figura 28B, se constata que el lavado de la veratridina no es capaz de prevenir la muerte que se inició con los pulsos de 20 a 60 min. En la Figura 28C se representa la muerte celular inducida por pulsos de veratridina de 20 a 60 min de duración. Obsérvese que la LDH liberada aumentó en forma proporcional a la duración del pulso veratridínico. Este aumento se mitigó de forma drástica cuando las células se trataron con 30 μ M de CGP, añadido al terminar el pulso de veratridina (Figura 28C).

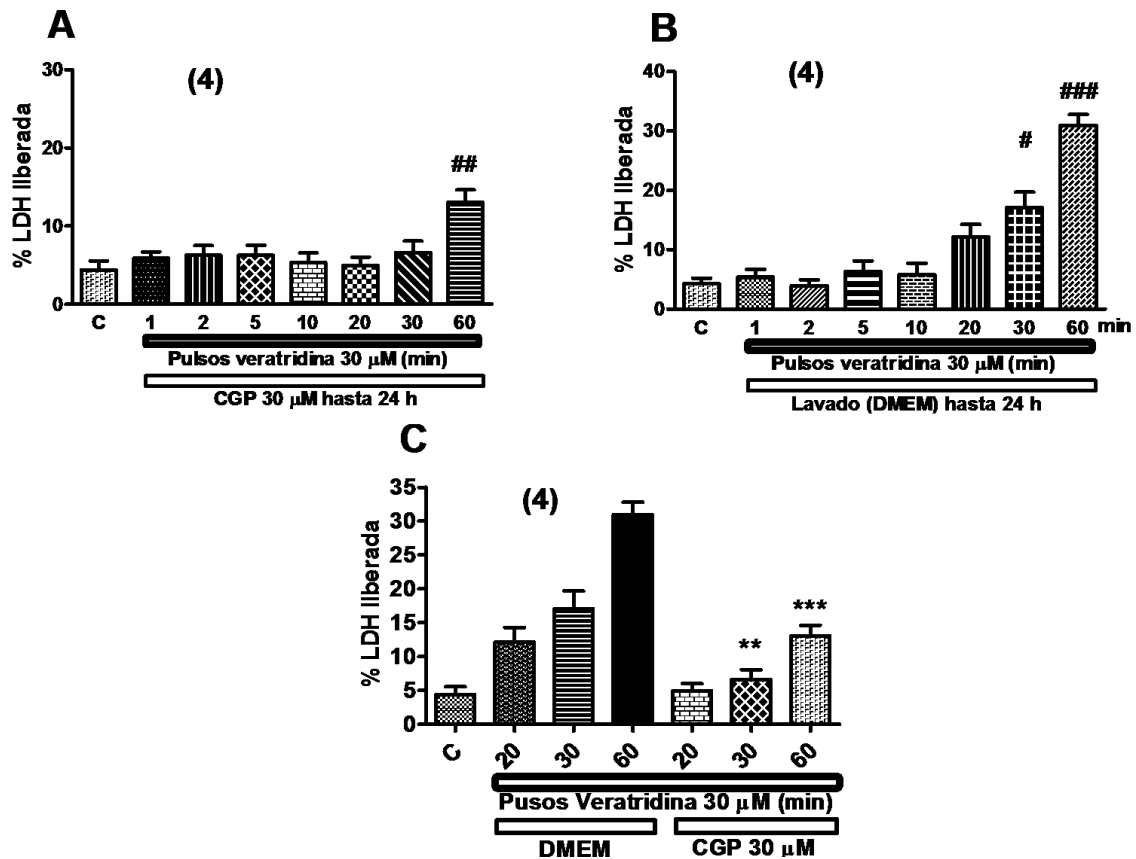


Figura 28 Efectos citotóxicos ejercidos por pulsos de veratridina 30 μM, de 1 a 60 min de duración seguido de un periodo de incubación sin veratridina de 24 h, en presencia (panel **A**) o ausencia (panel **B**) de 30 μM de CGP. **C**, se ha comparado los efectos del lavado o del tratamiento con el CGP después de la exposición de las células a veratridina solo en los tiempos que mostraron diferencias significativa con respecto al control. Los datos son medias \pm S.E.M. de la cantidad de experimentos que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en diferentes cultivos. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, con respecto al control; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, con respecto al lavado con DMEM.

La Figura 29 muestra un experimento en el que las células se expusieron a un pulso de veratridina de 2 h de duración. A continuación, tras 0-60 min de lavado de la veratridina, las células se incubaron con CGP o ω -conotoxina MVIIC hasta las 24 h. En el panel A, se ve claramente como el CGP 30 μM ha rescatado las células cromafines bovinas expuestas a veratridina durante 2 h, en un 50%. En el panel B, la ω -conotoxina MVIIC solo protege cuando se lava el tóxico por tiempos \geq a 10 min, no haciéndolo cuando el lavado es de 3 min o cero min.

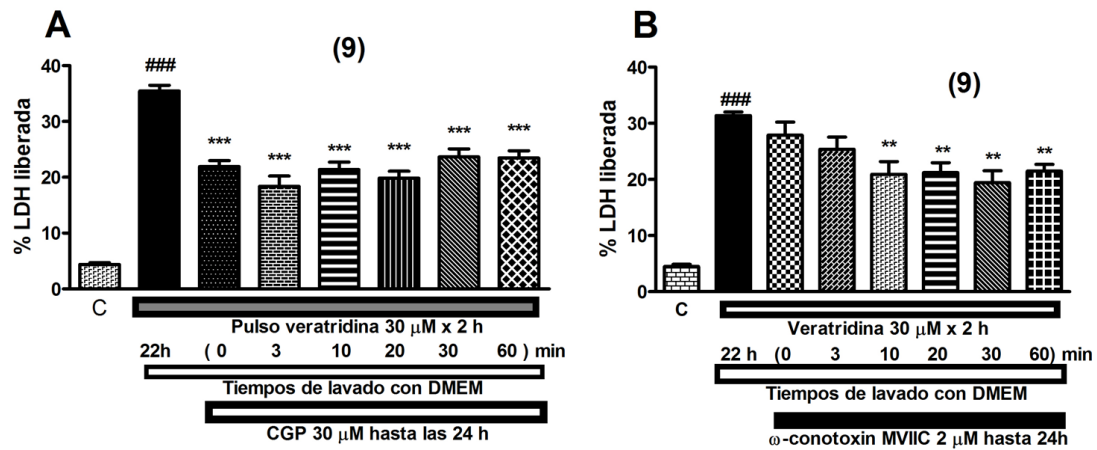


Figura 29 Efectos del CGP y ω -conotoxina MVIIC sobre la citotoxicidad de pulsos de veratridina de 2 h de duración, aplicados antes de añadir los compuestos. **A**, Las CCB se pre-trataron con Ver 30 μ M durante 2 h, luego se lavaron con DMEM por el tiempo indicado en paréntesis, a continuación se adicionó el CGP 30 μ M hasta las 24 h. **B**, después de 2 h de exposición de las CCB a Ver 30 μ M, se procesó al lavado con DMEM durante el tiempo indicado en paréntesis, luego se adicionó la ω -conotoxina MVIIC 2 μ M hasta las 24 h. Los datos son medias \pm S.E.M. de la cantidad de experimentos que se muestra en paréntesis; cada experimento se realizó en diferentes cultivos. ###p<0.001, con respecto al control; **p<0.01; ***p<0.001, con respecto a solamente a Ver.

(VI) DISCUSIÓN

El hallazgo central de esta tesis doctoral se relaciona con el hecho de que el CGP37157 previene la muerte de las células cromafines bovinas y de las neuronas de rodajas de hipocampo de rata, que se hicieron vulnerables sometiénolas a un estrés a base de veratridina, un modelo de muerte neuronal por apoptosis (Jordan *et al.*, 2000), debido a la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} que induce la veratridina (Maroto *et al.*, 1994). Si la neuroprotección ejercida por el CGP se debiera exclusivamente a su capacidad para bloquear el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX) estaríamos en disposición de aceptar la hipótesis planteada aquí, a saber: que la modulación farmacológica del mNCX podría constituirse en un nuevo blanco terapéutico para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos neuroprotectores para tratar las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el CGP también reconoce otras dianas; ello plantea una nueva hipótesis, que se relaciona con la idea de que un medicamento multidiana, que actúe en dos o más de las encrucijadas metabólicas que conducen a la apoptosis y la muerte neuronal, podría ser más eficaz para tratar las enfermedades neurodegenerativas. Para intentar comprender el o los mecanismos implicados en la acción neuroprotectora del CGP, primero debemos entender el o los mecanismos implicados en la acción neurotóxica de la veratridina.

En la Figura 30 se resume la secuencia de las etapas que conducen a la muerte de las células cromafines (y de las neuronas) tratadas con veratridina. Aunque alguna de estas etapas no dejan de ser conjeturas (por ejemplo, que la mitocondria se sobrecargue de Ca^{2+} en células incubadas con veratridina), muchas de ellas están documentadas, como se ilustra en las referencias que se citan en el pie de figura. Partimos de la base de que el CGP produce neuroprotección porque inhibe el mNCX; sin embargo, sus efectos sobre otros canales iónicos y transportadores también podrían contribuir a su efecto neuroprotector.

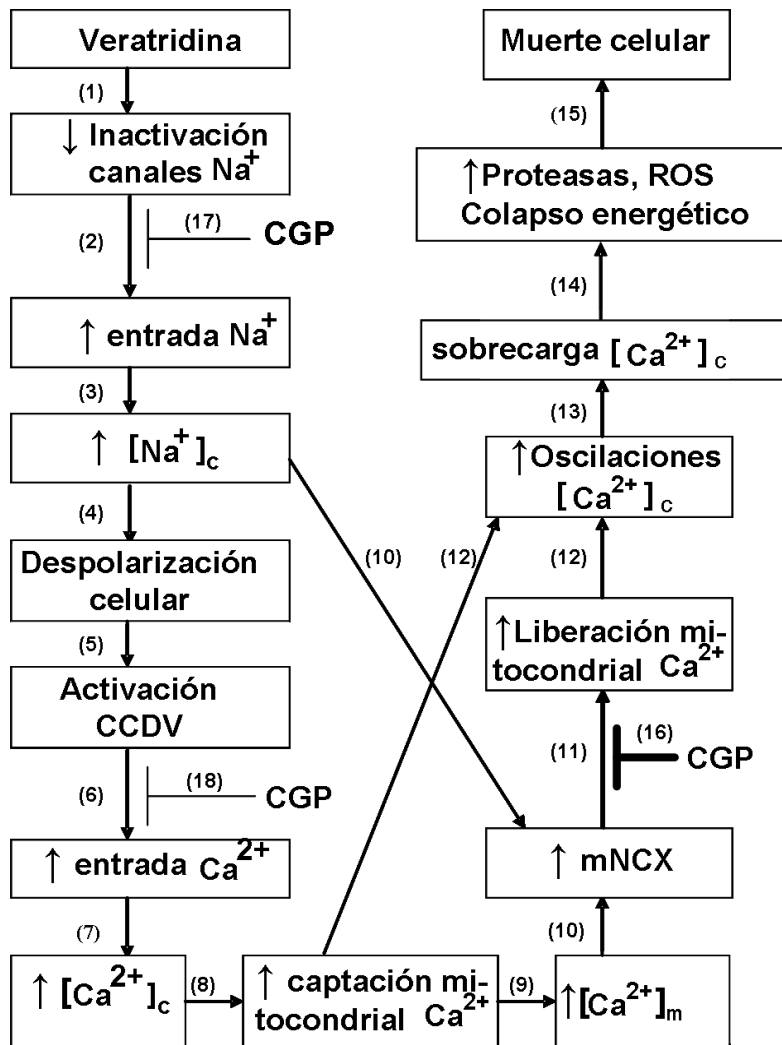


Figura 30. Una propuesta de la secuencia del mecanismo de alteración homeostática de Na^+ y Ca^{2+} , que lleva a la muerte de las células cromafines bovinas incubadas con veratridina, y el mecanismo de citoprotección que ofrece el CGP37157 (CGP). (1) la veratridina retrasa la inactivación de los canales de Na^+ (Ota *et al.*, 1973); (2) se produce una mayor entrada de Na^+ por la no inactivación de los canales de Na^+ (Kilpatrick *et al.*, 1982), (3) aumenta la $[\text{Na}^+]_c$ y causa despolarización celular (4) (Lopez *et al.*, 1995); lo que conduce a la apertura celular de los CCDV (5), aumentando la entrada Ca^{2+} (6), así como $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (7) (Maroto *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1995; Maroto *et al.*, 1996); la mitocondria percibe esos aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y el uniportador eleva la captación de dicho Ca^{2+} por la mitocondria (8) (Montero *et al.*, 2000; Villalobos *et al.*, 2002) y aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ (9) (Montero *et al.*, 2000; Villalobos *et al.*, 2002); los aumentos de $[\text{Na}^+]_c$ y de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ incrementan la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX) (10) (Uceda *et al.*, 1995), lo que lleva a una más rápida liberación Ca^{2+} al citosol (11) que contribuye a la generación de pronunciadas oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Maroto *et al.*, 1994; Maroto *et al.*, 1996; Novalbos *et al.*, 1999); lo que conduce finalmente a la sobrecarga citosólica de Ca^{2+} (13), la activación de proteasas, mal plegamiento de proteínas, estrés oxidativo, colapso energético (14) y la muerte celular (15) (Sapolsky, 2001; Krantic *et al.*, 2005; Bredesen *et al.*, 2006; Sedlak & Snyder, 2006). La inhibición del mNCX por el compuesto CGP (16) ralentiza el ritmo de liberación mitocondrial de Ca^{2+} , con lo que mitiga rápidamente los cambios $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y por tanto, causa citoprotección contra la toxicidad de veratridina. El bloqueo parcial del I_{Na} (17) e I_{Ca} (18) también podrían contribuir a los efectos citoprotectores del CGP.

Por retrasar la inactivación de los canales de Na^+ (Ota *et al.*, 1973) la veratridina aumenta la entrada de Na^+ en la célula cromafin bovina (Kilpatrick *et al.*, 1982); el aumento de la concentración citosólica de Na^+ ($[\text{Na}^+]_c$) ocasiona la

despolarización celular (Lopez *et al.*, 1995), la apertura de los CCDV de los subtipos L, N y PQ (Garcia *et al.*, 2006) y una entrada aumentada de Ca^{2+} en la célula, que genera grandes oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Este Ca^{2+} se capta en la mitocondria lo que origina un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Aunque no lo sabemos, es plausible que se establezca una futil circulación mitocondrial del Ca^{2+} en células tratadas con veratridina, probablemente porque el aumento de la $[\text{Na}^+]_c$ activa el mNCX de tal manera que el Ca^{2+} acumulado en la mitocondria vuelva al citosol; este Ca^{2+} vuelve a recuperarse en la mitocondria, generándose así una mCC inútil y generadora de radicales libres que además, podría abrir el poro de transición mitocondrial y activar la vía de la apoptosis. Por otra parte, la presencia continuada de una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ elevada activaría proteasas que contribuirían también a la muerte neuronal (Figura 30).

En principio, esta muerte neuronal veratridínica podría evitarse con fármacos o compuestos que interrumpan esta cadena metabólica en cualquiera de sus etapas, desde las más incipientes a las más tardías. De hecho la TTX, que bloquea por completo los canales de Na^+ , evita por completo los efectos neurotóxicos de la veratridina, tanto en células cromafines como en rodajas de hipocampo. Pero mientras que a 1 μM la TTX bloqueó al 100% la I_{Na} , el CGP la bloqueó tan solo un 50% a la concentración de 22 μM , que produce una citoprotección superior al 90% en células cromafines incubadas con veratridina. Sería interesante realizar una curva concentración-efecto con TTX para intentar correlacionar sus efectos sobre la I_{Na} y citoprotección frente a veratridina.

Otras dianas potenciales para el CGP son los canales de Ca^{2+} de umbral alto, los denominados N, P y Q. Para esclarecer este punto recurriré a algunos datos de la literatura y a los experimentos nuevos realizados en esta tesis. Así, la flunarizina, que bloquea los canales de calcio L, N y PQ, protege contra la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} , y la consiguiente muerte neuronal, en cultivos de neuronas corticales de rata incubadas con veratridina (Pauwels *et al.*, 1989). Por otra parte, el bloqueo completo de los canales de calcio con flunarizina o con una combinación de nimodipino (un bloqueante de los canales L) y ω -conotoxina MVIIC (un bloqueante de los canales N y PQ), también protege a

las células cromafines incubadas con veratridina (Maroto *et al.*, 1994; Maroto *et al.*, 1996; Cano-Abad *et al.*, 1998; Novalbos *et al.*, 1999). También en esta tesis hemos logrado este grado alto de citoprotección con la combinación de Nimodipino, ω -conotoxina MVIIC (un bloqueante de canales N) y ω -agatoxina IVA (un bloqueante de los canales PQ). Parece claro que el bloqueo parcial de la entrada de Ca^{2+} en la célula, vía canales de Ca^{2+} , no basta para producir una citoprotección sustancial frente a veratridina. De hecho, cuando las células cromafines o las rodajas se incubaron con veratridina y un solo bloqueante de algún subtipo de canales de calcio (por ejemplo, nimodipino, ω -conotoxina GVIA, ω -agatoxina IVA u ω -conotoxina MVIIC) se produjeron escasos o nulos efectos neuroprotectores. No parece existir por tanto una relación directa entre la fracción de la entrada de Ca^{2+} por un determinado subtipo de canal de calcio y el grado de neurotoxicidad veratridínica y el de la protección ejercida por cada bloqueante. De los experimentos comentados parece desprenderse la idea de que para producir neuroprotección en las preparaciones tratadas con la veratridina, debe bloquearse de forma contundente la entrada de Ca^{2+} en la célula.

Una vez que se ha esclarecido el papel de la entrada de Ca^{2+} , y el efecto del bloqueo parcial o total de esa entrada, en la neurotoxicidad veratridínica, nos encontramos en disposición de abordar la cuestión de en qué medida el efecto neuroprotector del CGP se debe a su capacidad para bloquear los canales de Ca^{2+} . A 10 y 30 μM , el CGP inhibió I_{Ca} un 20 y un 60%, respectivamente, en células cromafines. Si recurrimos a la argumentación esgrimida con anterioridad, parece justo concluir que el bloqueo parcial de la entrada de Ca^{2+} no explica por sí solo el pronunciado efecto citoprotector del CGP. Pero además, a 10 μM el CGP produjo una citoprotección del 50% mientras que el nimodipino tan solo redujo un 10% la mortalidad veratridínica; considerando que ambos compuestos inhiben por igual I_{Ca} (un 20%) parece claro que el mayor efecto citoprotector del CGP se debe a un efecto distinto del nuevo bloqueo parcial de la entrada de Ca^{2+} en la célula. Cabría hacer una argumentación parecida con la concentración 20 μM de CGP que bloquea un porcentaje de I_{Ca} similar al que bloquea la ω -conotoxina GVIA; sin embargo,

mientras que el CGP produjo un 70% de citoprotección, la toxina no redujo la toxicidad veratridínica. En esta comparación entre bloqueantes de canales de calcio y CGP cabe finalmente destacar como muy ilustrativo el caso de la ω -agatoxina IVA. A 30 μ M el CGP bloquea un 50-60% I_{Ca} , justo la misma proporción de inhibición que la ejercida por una concentración supramáxima (2 μ M) de ω -agatoxina IVA. Sin embargo, el CGP produjo una citoprotección cercana al 100% mientras que la ω -agatoxina IVA tan solo redujo un 20% la toxicidad veratridínica.

Hay además algunos datos adicionales que refuerzan la idea de que los efectos neuroprotectores del CGP no se explican tan solo en base a sus efectos bloqueantes de los canales de Na^+ y Ca^{2+} del plasmalema. Este bloqueo desaparece tras 1-3 min del lavado del compuesto. Pues bien, si las células cromafines se pre-incuban con CGP y este se lava 3 min antes de adicionar la veratridina (cuando su efecto sobre los canales de Na^+ y Ca^{2+} ya ha desaparecido), todavía se observa una sustancial citoprotección. Además, el CGP también ejerció efectos citoprotectores incluso cuando se administró tras un pulso de veratridina; este efecto pos-estrés reviste interés adicional en el contexto de definir el perfil neuroprotector del compuesto, con vistas a tomarlo como modelo para una eventual investigación y desarrollo de nuevos compuestos neuroprotectores.

Hay un dato adicional que merece un comentario aparte, y que apoya la idea de que, al menos en la célula cromafin bovina, el CGP produce un cambio drástico en la cinética de aclaramiento de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ producidos por pulsos despolarizantes de K^+ (Montero *et al.*, 2000). En esos experimentos, realizados en colaboración con el Profesor García-Sancho y el ITH, utilizando ecurinas dirigidas a la mitocondria, se observó un paralelismo entre las cinéticas de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_m$, tras la aplicación de un pulso de K^+ ; esos transientes se generan por la entrada de Ca^{2+} vía canales de Ca^{2+} de la célula cromafin (Douglas & Rubin, 1963). A 20 μ M, el CGP enlenteció considerablemente la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria al citosol, como cabe esperar del bloqueo del mNCX. Sin embargo, la amplitud de los transientes de

$[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_m$ producidos por el pulso de K^+ no variaron en la presencia de 20 μM de CGP; ello sugiere que a esta concentración el CGP afectó poco la entrada de Ca^{2+} vía canales de calcio pero, sin embargo, produce más del 90% de protección frente a veratridina.

Hasta aquí todo parece indicar que los efectos neuroprotectores del CGP en células cromafines y en rodajas de hipocampo, no se explican por un posible efecto colateral de este compuesto sobre los canales de Na^+ y Ca^{2+} del plasmalema; al menos, no solo por eso. Preciso es que aceptemos que su conocido efecto bloqueante del mNCX podría estar vinculado a su acción neuroprotectora, descrita por vez primera en esta tesis doctoral. Pero al considerar esta diana como eje central del efecto neuroprotector del CGP, se choca con la idea ampliamente aceptada de que la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} lleva a la muerte de la célula (Duchen, 2000). Por ello, parece paradójico que el CGP produzca protección cuando, en realidad, el enlentecimiento de la salida de Ca^{2+} de la mitocondria que se produce al inhibir el mNCX debería incrementar la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y la muerte neuronal. Esto ocurre con la mutación de la proteína mitocondrial PINK1 que está implicada en la patogenia de la enfermedad de Parkinson. La tal proteína mutada disminuye la actividad del mNCX, lo que ocasiona una sobrecarga de Ca^{2+} , la apertura del mPTP y la muerte de neuronas vulnerables (Gandhi *et al.*, 2009). Pero esta capacidad de acumular Ca^{2+} también se ha interpretado en el sentido opuesto, en el sentido de que por retirar el Ca^{2+} que se encuentra en exceso en el citosol, la mitocondria ejercería acciones neuroprotectoras (Nicholls, 1985; White & Reynolds, 1995). Este concepto encaja bien en la hipótesis del punto crítico en la concentración citosólica del Ca^{2+} : más allá de ese punto, las $[Ca^{2+}]_c$ elevadas son neurotóxicas (Koike *et al.*, 1989). Nuestros experimentos sugieren que una ligera inhibición del mNCX por el CGP podría enlentecer la salida del Ca^{2+} mitocondrial al citosol y ayudar a mantener la $[Ca^{2+}]_c$ en un rango fisiológico, que favorecería la supervivencia de las neuronas vulnerables.

La veratridina se ha utilizado para incrementar la excitabilidad neuronal y producir modelos de epilepsia que producen ráfagas repetidas de potenciales de acción y muerte neuronal (Otoom *et al.*, 1998). Plantearse en este momento

si los modelos de neurotoxicidad por veratridina son extrapolables a la clínica de las enfermedades neurodegenerativas, parece prematuro. Aquí hemos tratado de aportar datos para someter a escrutinio la hipótesis de la mCC y la posibilidad de que su control farmacológico pudiera conducir a nuevas estrategias neuroprotectoras. En este sentido, cabe destacar que tanto la sobrecarga citosólica de Na^+ como la de Ca^{2+} producida por la veratridina se adapta perfectamente a nuestros objetivos. La mitocondria ve rápidamente las elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y además, el aumento de la $[\text{Na}^+]_c$ activa aún más el mNCX (Duchen, 2000). Por tanto, cabe esperar que en las células cromafines y en las neuronas hipocámpales, la veratridina va a acelerar la velocidad de la entrada y salida del Ca^{2+} , en y desde la mitocondria. Está por ver si esta aceleración del mCC es un mecanismo que deteriora la bionergética mitocondrial y que, por tanto, su modulación farmacológica podría ejercer efectos neuroprotectores. En cualquier caso, parece aceptable que el CGP podría mitigar los cambios exagerados de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se producirían en condiciones patológicas. Ello va en línea con la observación de que el CGP bloquee las grandes oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en células cromafines incubadas con veratridina, hecho que también se produce con las oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en neuronas del asta anterior de la médula espinal fetal del ratón (Fabbro *et al.*, 2007).

Si el CGP (o una determinada manipulación de la mCC) pudiera acoplar la demanda de la energía a la producción de ATP en las neuronas vulnerables, estas podrían mejorar sus perspectivas de vida. Esta idea va en la línea de la esbozada por Jouaville y Col. (1999) en el sentido de que el ajuste de la velocidad de la circulación mitocondrial del Ca^{2+} es un mecanismo del que se vale la célula para regular la actividad calcio-dependiente de las dehidrogenasas para acoplar la actividad neuronal (por ejemplo) a la producción de ATP. Este ajuste bioenergético sería especialmente crítico en neuronas vulnerables; está por ver si la situación de estas neuronas en las enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo las colinérgicas en la EA, las dopaminérgicas en la EP o las motoras en la ELA) remeda a la situación creada por la veratridina en nuestras células cromafines y rodajas de hipocampo. Pero la hipótesis aquí planteada cuenta ya con el apoyo de los

experimentos de esta tesis. Y la de algunos datos que demuestran que el CGP aumenta la síntesis de ATP para ejercer efectos cardíacos inotrópicos positivos (Cox & Matlib, 1993) y también eleva la producción de ATP en células Hela estimuladas con histamina (Hernandez-SanMiguel *et al.*, 2006).

El concepto “si protegemos la mitocondria protegemos la neurona vulnerable”, que emana de esta tesis, tiene cierta base experimental. De hecho, encontramos que el incremento de la producción de radicales libres en células cromafines incubadas con veratridina, que es de origen mitocondrial (Jordan *et al.*, 2000), se mitigó drásticamente cuando estuvo presente el CGP. La veratridina también produjo una despolarización de la mitocondria, lo que indica que esta organela si está captando el Ca^{2+} del citosol y que, probablemente, esté contribuyendo a la formación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante la incubación de las células con veratridina. Pues bien, también el CGP bloqueó estas oscilaciones probablemente como consecuencia de la reducción de la despolarización de la mitocondria. Finalmente, cabe considerar el hecho de que la veratridina aumenta la liberación del citocromo c, desde la mitocondria al citosol, y de que el CGP inhibiera dicha liberación, Sabido es que la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} conlleva la apertura del mPTP y la consiguiente liberación de citocromo c, la señal que inicia en el citosol la cadena de eventos que conducen a la apoptosis. Por tanto, el CGP inhibe esta cadena de eventos y puede tildarse con razón de protector mitocondrial pues inhibe la despolarización mitocondrial, la liberación de citocromo c y la excesiva producción de radicales libres.

El CGP también ejerció una acción protectora de la mitocondria en rodajas de hipocampo de rata, ya que redujo drásticamente la excesiva producción de radicales libres que causó la veratridina. Además, el CGP también redujo la activación de la MAPK p38 a su forma fosforilada, que se incrementa notablemente aumentada durante la incubación con veratridina de las rodajas de hipocampo. Este efecto del CGP puede también tildarse de antiapoptótico ya que la vía de la MAPK se ha implicado en la muerte celular (Xia *et al.*, 1995; Hetman *et al.*, 1999). De hecho, la inhibición de la MAPK p38 se está investigando como una estrategia terapéutica en el ictus (Ward *et al.*, 2001).

Cabe hacer unas consideraciones finales sobre la validez de los postulados mito- y neuroprotectores que emanan de los experimentos realizados en esta tesis con el compuesto CGP37157 y con los bloqueantes de canales de calcio. También se han realizado experimentos con dimebona, ciclosporina A y A β para intentar proteger la mitocondria mediante una intervención farmacológica a nivel del mPTP. No he incluido esos experimentos en esta tesis porque están incompletos, pero algunos de los resultados iniciales pueden orientar sobre el perfil que debería tener un fármaco cuya diana fuera la mitocondria, con el fin de aumentar su función bioenergética en las neuronas vulnerables de las enfermedades neurodegenerativas.

La primera pregunta que podría hacerse es si un fármaco que inhiba el mNCX, con más potencia y selectividad, sería un mito- y neuroprotector más eficaz que el propio CGP. Los químicos del ITH ya han sintetizado algunos derivados del CGP cuyo estudio farmacológico se encuentra en fases incipientes (comunicación personal del doctor Cristóbal de los Ríos). Si alguno de estos compuestos bloqueara el mNCX sin afectar los canales de calcio, sería una herramienta farmacológica para reforzar la hipótesis esgrimida en esta tesis, en el sentido de que dicho intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial podría ser una novedosa diana para el desarrollo de fármacos mitoprotectores y neuroprotectores. Ahora bien, cabe hacerse una segunda pregunta relacionada con el concepto de fármacos multidiana, esbozada en la Introducción. La posibilidad de atacar con una misma molécula el mNCX y el mPTP es también atractiva: con ello lograríamos, por un lado, enlentecer la mCC para favorecer la síntesis de ATP y por el otro, prevenir la apertura del mPTP, mitigando así el riesgo de que se active la cadena apoptótica.

Cabe una tercera pregunta relacionada con el bloqueo simultáneo del mNCX y de los canales de calcio del plasmalema es decir, un compuesto que remedara en cierta forma al CGP37157; con ello lograríamos amortiguar los transientes bruscos de la [Ca²⁺]_c durante la actividad neuronal por varios mecanismos: (a) disminuir la entrada de Ca²⁺ vía canales de calcio; (b) retirada del Ca²⁺ citosólico elevado por la mitocondria; (c) mantenimiento durante más tiempo del

Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, con la consiguiente mejora de la síntesis de ATP; y (d) cesión más lenta del Ca^{2+} , desde la mitocondria al citosol.

Recientemente he estado haciendo algunos experimentos con el compuesto KB-R7943 (KBR), un inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del plasmalema (pNCX), particularmente cuando dicho transportador trabaja en reverso al elevarse la $[\text{Na}^+]_c$, cosa que acontece con la veratridina. Curiosamente, he observado que el KBR protege tanto las células cromafines como las rodajas de hipocampo, frente al estrés veratridínico. Ahora estoy explorando la existencia de una posible aditividad neuroprotectora con concentraciones subefectivas de CGP (inhibidor del mNCX) y del KBR (inhibidor del pNCX), con la idea de sintetizar un compuesto multidiana que module simultáneamente a ambos transportadores, y que mejore la homeostasia del Ca^{2+} y la bioenergética de las neuronas vulnerables de las enfermedades neurodegenerativas.

(VII) CONCLUSIONES

En esta tesis he sometido a escrutinio la hipótesis de que la modulación farmacológica del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la mitocondria (mNCX) pudiera mejorar la homeostasia neuronal del Ca^{2+} . Con ello se lograría aumentar la bioenergética mitocondrial, mejorando así las posibilidades de supervivencia de las neuronas vulnerables de las enfermedades neurodegenerativas. El compuesto CGP37157, un inhibidor del mNCX, se ha utilizado como herramienta farmacológica para comprobar la verosimilitud de la hipótesis aquí planteada. El CGP produjo efectos neuroprotectores en dos modelos de muerte celular por sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} a saber, el cultivo primario de células cromafines de adrenal bovina y las rodajas de hipocampo de cerebro de rata. Dicha protección se debe a la mejora de la función mitocondrial, pues el CGP previno la despolarización mitocondrial, la producción de radicales libres y la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol. Dado que el CGP produce un bloqueo parcial de los canales de calcio dependientes de voltaje del plasmalema, existe la posibilidad de que este efecto, junto con su acción inhibidora del mNCX, contribuya a la neuroprotección. En cualquier caso, mis experimentos apoyan la hipótesis de que la regulación farmacológica de la circulación mitocondrial de Ca^{2+} podría constituir una nueva estrategia para el desarrollo de nuevas medicaciones neuroprotectoras para tratar las enfermedades neurodegenerativas. Esta hipótesis está inspirando el diseño y síntesis de nuevos compuestos moduladores del mNCX y del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, que está siendo llevada a cabo por los químicos del ITH.

(VIII) AYUDAS DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo fue apoyado por las siguientes ayudas de las Instituciones Españolas a AGG: (1) Fundación CIEN, IS Carlos III, N ° PI016/09; (2) Agencia Laín Entralgo, Comunidad de Madrid, N ° NDE07/09; (3) MICINN, SAF2006-03589; (4) Comunidad Autónoma de Madrid SAL2006/0275; (5) IS Carlos III, RD 06/0026 RETICS, RENEVAS. SMN es un becario de la Universidad Agostinho Neto, de Angola. Damos las gracias al continuo apoyo de la Fundación Teófilo Hernando.

(IX) BIBLIOGRAFIA

- Abramov AY & Duchen MR. (2008). Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 953-964.
- Alper G, Girgin FK, Ozgonul M, Montes G & Ersoz B. (1999). MAO inhibitors and oxidant stress in aging brain tissue. *Eur Neuropsychopharmacol* **9**, 247-252.
- Arias E, Ales E, Gabilan NH, Cano-Abad MF, Villarroya M, Garcia AG & Lopez MG. (2004). Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **46**, 103-114.
- Arias E, Gallego-Sandin S, Villarroya M, Garcia AG & Lopez MG. (2005). Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1346-1353.
- Arroyo G, Aldea M, Fuentealba J & Garcia AG. (2002). [Nicotinic Receptor, galantamine and Alzheimer disease]. *Rev Neurol* **34**, 1057-1065.
- Ashton D, Willems R, Marrannes R & Janssen PA. (1990). Extracellular ions during veratridine-induced neurotoxicity in hippocampal slices: neuroprotective effects of flunarizine and tetrodotoxin. *Brain Res* **528**, 212-222.
- Bachurin S, Bukatina E, Lermontova N, Tkachenko S, Afanasiev A, Grigoriev V, Grigorieva I, Ivanov Y, Sablin S & Zefirov N. (2001). Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer. *Ann N Y Acad Sci* **939**, 425-435.
- Bachurin SO, Shevtsova EP, Kireeva EG, Oxenkrug GF & Sablin SO. (2003). Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents. *Ann N Y Acad Sci* **993**, 334-344; discussion 345-339.
- Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassiss S, Kumar S, Badger AM, Legos JJ, Erhardt JA, Ohlstein EH, Hunter AJ, Harrison DC, Philpott K, Smith BR, Adams JL & Parsons AA. (2001). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. *Med Res Rev* **21**, 129-145.
- Belluti F, Rampa A, Piazzzi L, Bisi A, Gobbi S, Bartolini M, Andrisano V, Cavalli A, Recanatini M & Valenti P. (2005). Cholinesterase inhibitors: xanthostigmine derivatives blocking the acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. *J Med Chem* **48**, 4444-4456.

- Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F & Forte MA. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *Febs J* **273**, 2077-2099.
- Berridge MJ, Bootman MD & Lipp P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-648.
- Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL & Perl DP. (1995). Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* **52**, 81-88.
- Birks J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005593.
- Bolognesi ML, Andrisano V, Bartolini M, Banzi R & Melchiorre C. (2005). Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid-beta aggregation. *J Med Chem* **48**, 24-27.
- Bolognesi ML, Cavalli A & Melchiorre C. (2009). Memoquin: a multi-target-directed ligand as an innovative therapeutic opportunity for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **6**, 152-162.
- Bolognesi ML, Minarini A, Tumiatti V & Melchiorre C. (2006). Lipoic acid, a lead structure for multi-target-directed drugs for neurodegeneration. *Mini Rev Med Chem* **6**, 1269-1274.
- Boller F, Mizutani T, Roessmann U & Gambetti P. (1980). Parkinson disease, dementia, and Alzheimer disease: clinicopathological correlations. *Ann Neurol* **7**, 329-335.
- Bredesen DE, Rao RV & Mehlen P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature* **443**, 796-802.
- Brini M, Pinton P, King MP, Davidson M, Schon EA & Rizzuto R. (1999). A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nat Med* **5**, 951-954.
- Brown DF, Risser RC, Bigio EH, Tripp P, Stiegler A, Welch E, Eagan KP, Hladik CL & White CL, 3rd. (1998). Neocortical synapse density and Braak stage in the Lewy body variant of Alzheimer disease: a comparison with classic Alzheimer disease and normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 955-960.
- Cano-Abad MF, Garcia AG, Sanchez-Garcia P & Lopez MG. (2000). Ba(2+)-induced chromaffin cell death: cytoprotection by Ca(2+) channel antagonists. *Eur J Pharmacol* **402**, 19-29.
- Cano-Abad MF, Lopez MG, Hernandez-Guijo JM, Zapater P, Gandia L, Sanchez-Garcia P & Garcia AG. (1998). Effects of the neuroprotectant

- lubeluzole on the cytotoxic actions of veratridine, barium, ouabain and 6-hydroxydopamine in chromaffin cells. *Br J Pharmacol* **124**, 1187-1196.
- Cano-Abad MF, Villarroya M, Garcia AG, Gabilan N & Lopez MG. (2002). Contribution of calcium entry through L-type calcium channels to chromaffin cell death. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 171-173.
- Cano-Abad MF, Villarroya M, Garcia AG, Gabilan NH & Lopez MG. (2001). Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem* **276**, 39695-39704.
- Carafoli E. (2003). Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci* **28**, 175-181.
- Castaldo P, Cataldi M, Magi S, Lariccia V, Arcangeli S & Amoroso S. (2009). Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Prog Neurobiol* **87**, 58-79.
- Cavalli A, Bolognesi ML, Capsoni S, Andrisano V, Bartolini M, Margotti E, Cattaneo A, Recanatini M & Melchiorre C. (2007). A small molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 3689-3692.
- Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatti V, Recanatini M & Melchiorre C. (2008). Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J Med Chem* **51**, 347-372.
- Cox DA & Matlib MA. (1993). Modulation of intramitochondrial free Ca^{2+} concentration by antagonists of Na^{+} - Ca^{2+} exchange. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 408-413.
- Crompton M, Capano M & Carafoli E. (1976). Respiration-dependent efflux of magnesium ions from heart mitochondria. *Biochem J* **154**, 735-742.
- Chiesi M, Schwaller R & Eichenberger K. (1988). Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Biochem Pharmacol* **37**, 4399-4403.
- Chohan MO & Iqbal K. (2006). From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **10**, 81-87.
- Choi DW, Viseskul V, Amirthanayagam M & Monyer H. (1989). Aspartate neurotoxicity on cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* **23**, 116-121.
- de los Rios C, Marco JL, Carreiras MD, Chinchon PM, Garcia AG & Villarroya M. (2002). Novel tacrine derivatives that block neuronal calcium channels. *Bioorg Med Chem* **10**, 2077-2088.

- Dedeoglu A, Cormier K, Payton S, Tseitlin KA, Kremsky JN, Lai L, Li X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI, Kowall NW, Rogers JT & Huang X. (2004). Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis. *Exp Gerontol* **39**, 1641-1649.
- Doody RS, Gavrilova SI, Sano M, Thomas RG, Aisen PS, Bachurin SO, Seely L & Hung D. (2008). Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* **372**, 207-215.
- Douglas WW & Rubin RP. (1963). The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol* **167**, 288-310.
- Dreses-Werringloer U, Lambert JC, Vingtdeux V, Zhao H, Vais H, Siebert A, Jain A, Koppel J, Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Pasquier F, Galimberti D, Scarpini E, Mann D, Lendon C, Campion D, Amouyel P, Davies P, Fosskett JK, Campagne F & Marambaud P. (2008). A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell* **133**, 1149-1161.
- Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX & Yan SD. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med* **14**, 1097-1105.
- Duchen MR. (1992). Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J* **283** (Pt 1), 41-50.
- Duchen MR. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* **529** Pt 1, 57-68.
- Dykens JA. (1994). Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *J Neurochem* **63**, 584-591.
- Edison P, Rowe CC, Rinne JO, Ng S, Ahmed I, Kemppainen N, Villemagne VL, O'Keefe G, Nagren K, Chaudhury KR, Masters CL & Brooks DJ. (2008). Amyloid load in Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia measured with [11C]PIB positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **79**, 1331-1338.
- Egea J, Rosa AO, Cuadrado A, Garcia AG & Lopez MG. (2007a). Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem* **102**, 1842-1852.

- Egea J, Rosa AO, Sobrado M, Gandia L, Lopez MG & Garcia AG. (2007b). Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in $\alpha 7$ nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience* **145**, 866-872.
- Fabbro A, Pastore B, Nistri A & Ballerini L. (2007). Activity-independent intracellular Ca^{2+} oscillations are spontaneously generated by ventral spinal neurons during development in vitro. *Cell Calcium* **41**, 317-329.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M & Wilcock GK. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66**, 137-147.
- Franklin JL & Johnson EM, Jr. (1992). Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci* **15**, 501-508.
- Fratiglioni L, Paillard-Borg S & Winblad B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol* **3**, 343-353.
- Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jonhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxen-Irving G, Garlind A, Vedin I, Vessby B, Wahlund LO & Palmblad J. (2006). Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol* **63**, 1402-1408.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, Duchen MR & Abramov AY. (2009). PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* **33**, 627-638.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R & Garcia-Sancho J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* **86**, 1093-1131.
- Garcia AG, Sala F, Reig JA, Viniegra S, Frias J, Fonteriz R & Gandia L. (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* **309**, 69-71.
- Gerber U, Gee CE & Benquet P. (2007). Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 56-61.
- Gilabert JA, Castejon R, Vargas JA, Durantez A & Artalejo AR. (1999). Characterization of adrenal medullary chromaffin cells by flow cytometry. *Cytometry* **37**, 32-40.

- Gillis KD, Pun RY & Misler S. (1991). Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch* **418**, 611-613.
- Goedert M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **16**, 460-465.
- Goedert M, Klug A & Crowther RA. (2006). Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **9**, 195-207.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE & Klug A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4051-4055.
- Gomperts SN, Rentz DM, Moran E, Becker JA, Locascio JJ, Klunk WE, Mathis CA, Elmaleh DR, Shoup T, Fischman AJ, Hyman BT, Growdon JH & Johnson KA. (2008). Imaging amyloid deposition in Lewy body diseases. *Neurology* **71**, 903-910.
- Gottfries CG. (1990). Neurochemical aspects on aging and diseases with cognitive impairment. *J Neurosci Res* **27**, 541-547.
- Grigorev VV, Dranyi OA & Bachurin SO. (2003). Comparative study of action mechanisms of dimebon and memantine on AMPA- and NMDA-subtypes glutamate receptors in rat cerebral neurons. *Bull Exp Biol Med* **136**, 474-477.
- Grossberg GT, Edwards KR & Zhao Q. (2006). Rationale for combination therapy with galantamine and memantine in Alzheimer's disease. *J Clin Pharmacol* **46**, 17S-26S.
- Grosskreutz J, Van Den Bosch L & Keller BU. (2010). Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* **47**, 165-174.
- Gunter TE & Pfeiffer DR. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* **258**, C755-786.
- Ha HC, Woster PM, Yager JD & Casero RA, Jr. (1997). The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11557-11562.
- Haass M, Serf C, Gerber SH, Kruger C, Haunstetter A, Vahl CF, Nobiling R & Kubler W. (1997). Dual effect of digitalis glycosides on norepinephrine release from human atrial tissue and bovine adrenal chromaffin cells: differential dependence on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 1615-1627.

- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
- Hanger DP, Anderton BH & Noble W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* **15**, 112-119.
- Hardy J, Chartier-Harlin MC & Mullan M. (1992). Alzheimer disease: the new agenda. *Am J Hum Genet* **50**, 648-651.
- Hardy J & Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- Harkany T, Hortobagyi T, Sasvari M, Konya C, Penke B, Luiten PG & Nyakas C. (1999). Neuroprotective approaches in experimental models of beta-amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **23**, 963-1008.
- Hernandez-SanMiguel E, Vay L, Santo-Domingo J, Lobaton CD, Moreno A, Montero M & Alvarez J. (2006). The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger plays a key role in the control of cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Cell Calcium* **40**, 53-61.
- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE & Xia Z. (1999). Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **274**, 22569-22580.
- Holmquist L, Stuchbury G, Berbaum K, Muscat S, Young S, Hager K, Engel J & Munch G. (2007). Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. *Pharmacol Ther* **113**, 154-164.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S & Drachman DA. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet* **356**, 1627-1631.
- Jordan J, Galindo MF, Calvo S, Gonzalez-Garcia C & Cena V. (2000). Veratridine induces apoptotic death in bovine chromaffin cells through superoxide production. *Br J Pharmacol* **130**, 1496-1504.
- Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA & Rizzuto R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13807-13812.
- Kalmijn S, van Boxtel MP, Ocke M, Verschuren WM, Kromhout D & Launer LJ. (2004). Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* **62**, 275-280.

- Kelly KM, Gross RA & Macdonald RL. (1991). Tetrahydroaminoacridine (THA) reduces voltage-dependent calcium currents in rat sensory neurons. *Neurosci Lett* **132**, 247-250.
- Kilpatrick DL, Slepatis RJ, Corcoran JJ & Kirshner N. (1982). Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J Neurochem* **38**, 427-435.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR & Newmeyer DD. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Koh JY & Choi DW. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* **20**, 83-90.
- Koike T, Martin DP & Johnson EM, Jr. (1989). Role of Ca²⁺ channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca²⁺ determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6421-6425.
- Korn SJ & Horn R. (1989). Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J Gen Physiol* **94**, 789-812.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S & Quirion R. (2005). Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* **28**, 670-676.
- Kuller LH. (2007). Statins and dementia. *Curr Atheroscler Rep* **9**, 154-161.
- Lai JC & Cooper AJ. (1986). Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* **47**, 1376-1386.
- Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G & Smith MA. (2007). Amyloid-beta in Alzheimer disease: the null versus the alternate hypotheses. *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 823-829.
- Lee HP, Casadesus G, Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA, Gustaw-Rothenberg K & Lerner A. (2009). All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* **9**, 1615-1621.
- Leon R, Marco-Contelles J, Garcia AG & Villarroja M. (2005). Synthesis, acetylcholinesterase inhibition and neuroprotective activity of new tacrine analogues. *Bioorg Med Chem* **13**, 1167-1175.

- Lermontova NN, Redkozubov AE, Shevtsova EF, Serkova TP, Kireeva EG & Bachurin SO. (2001). Dimebon and tacrine inhibit neurotoxic action of beta-amyloid in culture and block L-type Ca(2+) channels. *Bull Exp Biol Med* **132**, 1079-1083.
- Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N, Jr., Frautschy SA & Cole GM. (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* **25**, 3032-3040.
- Livett BG. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* **64**, 1103-1161.
- Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA & Allen DD. (2002). Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* **28**, 1-13.
- Lopez MG, Artalejo AR, Garcia AG, Neher E & Garcia-Sancho J. (1995). Veratridine-induced oscillations of cytosolic calcium and membrane potential in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **482 (Pt 1)**, 15-27.
- Macaskill AF, Rinholm JE, Twelvetrees AE, Arancibia-Carcamo IL, Muir J, Fransson A, Aspenstrom P, Attwell D & Kittler JT. (2009). Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* **61**, 541-555.
- Marco-Contelles J, Leon R, de los Rios C, Garcia AG, Lopez MG & Villarroya M. (2006a). New multipotent tetracyclic tacrines with neuroprotective activity. *Bioorg Med Chem* **14**, 8176-8185.
- Marco-Contelles J, Leon R, de Los Rios C, Guglietta A, Terencio J, Lopez MG, Garcia AG & Villarroya M. (2006b). Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* **49**, 7607-7610.
- Marco-Contelles J, Leon R, Lopez MG, Garcia AG & Villarroya M. (2006c). Synthesis and biological evaluation of new 4H-pyrano[2,3-b]quinoline derivatives that block acetylcholinesterase and cell calcium signals, and cause neuroprotection against calcium overload and free radicals. *Eur J Med Chem* **41**, 1464-1469.
- Marco JL, de los Rios C, Garcia AG, Villarroya M, Carreiras MC, Martins C, Eleuterio A, Morreale A, Orozco M & Luque FJ. (2004). Synthesis, biological evaluation and molecular modelling of diversely functionalized heterocyclic derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase and modulators of Ca2+ channels and nicotinic receptors. *Bioorg Med Chem* **12**, 2199-2218.

- Marin DB, Bierer LM, Lawlor BA, Ryan TM, Jacobson R, Schmeidler J, Mohs RC & Davis KL. (1995). L-deprenyl and physostigmine for the treatment of Alzheimer's disease. *Psychiatry Res* **58**, 181-189.
- Maroto R, De la Fuente MT, Artalejo AR, Abad F, Lopez MG, Garcia-Sancho J & Garcia AG. (1994). Effects of Ca²⁺ channel antagonists on chromaffin cell death and cytosolic Ca²⁺ oscillations induced by veratridine. *Eur J Pharmacol* **270**, 331-339.
- Maroto R, de la Fuente MT, Zapater P, Abad F, Esquerro E & Garcia AG. (1996). Effects of omega-conotoxin MVIIC on veratridine-induced cytotoxicity and cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Brain Res* **714**, 209-214.
- Martin LJ, Gertz B, Pan Y, Price AC, Molkentin JD & Chang Q. (2009). The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: involvement in the pathobiology of ALS mice. *Exp Neurol* **218**, 333-346.
- Mattson MP. (1996). Calcium and Free Radicals: Mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter-regulated developmental plasticity and cell death. *Perspect Dev Neurobiol* **3**, 79-91.
- Mattson MP. (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* **6**, 337-350.
- Mattson MP & Chan SL. (2001). Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci* **17**, 205-224.
- McCormack JG & Denton RM. (1993). Mitochondrial Ca²⁺ transport and the role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci* **15**, 165-173.
- McShane R, Areosa Sastre A & Minakaran N. (2006). Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003154.
- Melchiorre C, Andrisano V, Bolognesi ML, Budriesi R, Cavalli A, Cavrini V, Rosini M, Tumiatti V & Recanatini M. (1998). Acetylcholinesterase noncovalent inhibitors based on a polyamine backbone for potential use against Alzheimer's disease. *J Med Chem* **41**, 4186-4189.
- Melchiorre C, Antonello A, Banzi R, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M & Tumiatti V. (2003). Polymethylene tetraamine backbone as template for the development of biologically active polyamines. *Med Res Rev* **23**, 200-233.
- Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY, Kupfer DJ & Reynolds CF, 3rd. (1998). Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology* **18**, 407-430.

- Merlini L, Angelin A, Tiepolo T, Braghetta P, Sabatelli P, Zamparelli A, Ferlini A, Maraldi NM, Bonaldo P & Bernardi P. (2008). Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5225-5229.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J & Alvarez J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* **2**, 57-61.
- Mordente A, Martorana GE, Minotti G & Giardina B. (1998). Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). *Chem Res Toxicol* **11**, 54-63.
- Moreno-Ortega AJ, Ruiz-Nuno A, Garcia AG & Cano-Abad MF. (2010). Mitochondria sense with different kinetics the calcium entering into HeLa cells through calcium channels CALHM1 and mutated P86L-CALHM1. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 722-726.
- Moro MA, Garcia AG & Langley OK. (1991). Characterization of two chromaffin cell populations isolated from bovine adrenal medulla. *J Neurochem* **57**, 363-369.
- Moro MA, Lopez MG, Gandia L, Michelena P & Garcia AG. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem* **185**, 243-248.
- Moro MA, Michelena P, Sanchez-Garcia P, Palmer R, Moncada S & Garcia AG. (1993). Activation of adrenal medullary L-arginine: nitric oxide pathway by stimuli which induce the release of catecholamines. *Eur J Pharmacol* **246**, 213-218.
- Morphy R, Kay C & Rankovic Z. (2004). From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov Today* **9**, 641-651.
- Morphy R & Rankovic Z. (2005). Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem* **48**, 6523-6543.
- Morphy R & Rankovic Z. (2007). Fragments, network biology and designing multiple ligands. *Drug Discov Today* **12**, 156-160.
- Mudher A & Lovestone S. (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci* **25**, 22-26.
- Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R & Thal LJ. (2000). Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Jama* **283**, 1007-1015.

- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H & Tsujimoto Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14681-14686.
- Nicolau SM, de Diego AM, Cortes L, Egea J, Gonzalez JC, Mosquera M, Lopez MG, Hernandez-Guijo JM & Garcia AG. (2009). Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺-exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 844-854.
- Nicholls DG. (1985). A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog Brain Res* **63**, 97-106.
- Novalbos J, Abad-Santos F, Zapater P, Cano-Abad MF, Moradiellos J, Sanchez-Garcia P & Garcia AG. (1999). Effects of dotarizine and flunarizine on chromaffin cell viability and cytosolic Ca²⁺. *Eur J Pharmacol* **366**, 309-317.
- Octave JN. (1995). The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg* **95**, 197-209.
- Ota M, Narahashi T & Keeler RF. (1973). Effects of veratrum alkaloids on membrane potential and conductance of squid and crayfish giant axons. *J Pharmacol Exp Ther* **184**, 143-154.
- Otoom S, Tian LM & Alkadhi KA. (1998). Veratridine-treated brain slices: a cellular model for epileptiform activity. *Brain Res* **789**, 150-156.
- Pauwels PJ, Van Assouw HP, Leysen JE & Janssen PA. (1989). Ca²⁺-mediated neuronal death in rat brain neuronal cultures by veratridine: protection by flunarizine. *Mol Pharmacol* **36**, 525-531.
- Peng TI & Jou MJ. (2010). Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 183-188.
- Piazzzi L, Rampa A, Bisi A, Gobbi S, Belluti F, Cavalli A, Bartolini M, Andrisano V, Valenti P & Recanatini M. (2003). 3-(4-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation: a dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J Med Chem* **46**, 2279-2282.
- Quintanilla RA & Johnson GV. (2009). Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Res Bull* **80**, 242-247.
- Rae J, Cooper K, Gates P & Watsky M. (1991). Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* **37**, 15-26.

- Rao VR & Finkbeiner S. (2007). NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci* **30**, 284-291.
- Rice-Evans C & Miller NJ. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* **234**, 279-293.
- Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M & Pozzan T. (1994). Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol* **126**, 1183-1194.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G & Murri L. (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* **61**, 1-24.
- Rosini M, Andrisano V, Bartolini M, Bolognesi ML, Hrelia P, Minarini A, Tarozzi A & Melchiorre C. (2005). Rational approach to discover multipotent anti-Alzheimer drugs. *J Med Chem* **48**, 360-363.
- Rubenstein R, Kascsak RJ, Merz PA, Wisniewski HM, Carp RI & Iqbal K. (1986). Paired helical filaments associated with Alzheimer disease are readily soluble structures. *Brain Res* **372**, 80-88.
- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD & Greengard P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* **153**, 1403-1414.
- SantaCruz KS, Yazlovitskaya E, Collins J, Johnson J & DeCarli C. (2004). Regional NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 63-69.
- Sapolsky RM. (2001). Cellular defenses against excitotoxic insults. *J Neurochem* **76**, 1601-1611.
- Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H & Wanker EE. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549-558.
- Schneider LS, Olin JT & Pawluczyk S. (1993). A double-blind crossover pilot study of l-deprenyl (selegiline) combined with cholinesterase inhibitor in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* **150**, 321-323.
- Sedlak TW & Snyder SH. (2006). Messenger molecules and cell death: therapeutic implications. *Jama* **295**, 81-89.
- Shepherd JD & Huganir RL. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 613-643.
- Shimizu S, Narita M & Tsujimoto Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487.

- Skoog G & Skoog I. (1999). A 40-year follow-up of patients with obsessive-compulsive disorder [see comments]. *Arch Gen Psychiatry* **56**, 121-127.
- Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K & Masters CL. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* **14**, 2117-2127.
- Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Jr. & Chen LB. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3671-3675.
- Sobrado M, Roda JM, Lopez MG, Egea J & Garcia AG. (2004). Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett* **365**, 132-136.
- Sterling J, Herzig Y, Goren T, Finkelstein N, Lerner D, Goldenberg W, Miskolczi I, Molnar S, Rantal F, Tamas T, Toth G, Zagya A, Zekany A, Finberg J, Lavian G, Gross A, Friedman R, Razin M, Huang W, Kraiss B, Chorev M, Youdim MB & Weinstock M. (2002). Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and phenethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease. *J Med Chem* **45**, 5260-5279.
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E & Reynolds IJ. (1998). Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* **1**, 366-373.
- Sullivan FR, Bird ED, Alpay M & Cha JH. (2001). Remotivation therapy and Huntington's disease. *J Neurosci Nurs* **33**, 136-142.
- Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S & Gergel I. (2004). Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *Jama* **291**, 317-324.
- Thule T, Ahn JR & Woo SH. (2006). Inhibition of L-type Ca²⁺ channel by mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitor CGP-37157 in rat atrial myocytes. *Eur J Pharmacol* **552**, 15-19.
- Uceda G, Garcia AG, Guantes JM, Michelena P & Montiel C. (1995). Effects of Ca²⁺ channel antagonist subtypes on mitochondrial Ca²⁺ transport. *Eur J Pharmacol* **289**, 73-80.
- Usherwood PN, Machili P & Leaf G. (1968). L-Glutamate at insect excitatory nerve-muscle synapses. *Nature* **219**, 1169-1172.

- van Marum RJ. (2008). Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam Clin Pharmacol* **22**, 265-274.
- Vila M & Przedborski S. (2003). Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **4**, 365-375.
- Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J & Garcia-Sancho J. (2002). Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *Faseb J* **16**, 343-353.
- Villarroya M, Garcia AG & Marco JL. (2004). New classes of AChE inhibitors with additional pharmacological effects of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* **10**, 3177-3184.
- Wang Y, Santa-Cruz K, DeCarli C & Johnson JA. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is increased in hippocampal pyramidal neurons of patients with Aalzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**, 525-531.
- Ward KW, Prokscht JW, Azzaranot LM, Mumawa JA, Roethke TJ, Stelman GJ, Walsh MJ, Zeigler KS, McSurdy-Freed JE, Kehlert JR, Chokshi J, Levy MA & Smith BR. (2001). Preclinical pharmacokinetics of SB-203580, a potent inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *Xenobiotica* **31**, 783-797.
- White AR, Barnham KJ & Bush AI. (2006). Metal homeostasis in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* **6**, 711-722.
- White RJ & Reynolds IJ. (1995). Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J Neurosci* **15**, 1318-1328.
- Wilson SP. (1987). Purification of adrenal chromaffin cells on Renografin gradients. *J Neurosci Methods* **19**, 163-171.
- www.maxpowersite.com/ea_archivos/page326.html.
- www.alz.co.uk
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ & Greenberg ME. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-1331.
- Yao Z & Wood NW. (2009). Cell death pathways in Parkinson's disease: role of mitochondria. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2135-2149.
- Zhang S, Hedskog L, Petersen CA, Winblad B & Ankarcrona M. (2010). Dimebon (latterpirdine) enhances mitochondrial function and protects neuronal cells from death. *J Alzheimers Dis* **21**, 389-402.

Zheng H & Koo EH. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid.
Mol Neurodegener **1**, 5.

(X) **ARTÍCULO 1 RELACIONADO CON ESTA TESIS**

Nicolau et al., *JPET* **330**:844-854, 2009

(XI) ARTÍCULO 2 RELACIONADO CON ESTA TESIS

Nicolau et al. doi: 10.1016/J.bbrc.2010.08.028

Apocalipsis 22:13

«Yo soy el Alfa y la Omega, el primero y el último, el principio y el fin.»

Jeremías 9:23-24

«Así dijo Jehová: No se alabe el sabio en su sabiduría, ni en su valentía se alabe el valiente, ni el rico se alabe en sus riquezas. Mas alábese en esto el que se hubiere de alabar: en entenderme y conocerme, que yo soy Jehová, que hago misericordia, juicio y justicia en la tierra; porque estas cosas quiero, dice Jehová. »

